



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS

AUREANNA NAIRNE NEGRÃO MURAKAMI

**EFEITO DA NANOFILTRAÇÃO E DA
MICROENCAPSULAÇÃO POR *SPRAY DRYING* NA
ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DO
EXTRATO AQUOSO DE *Ilex paraguariensis* A. ST. HIL.**

**Florianópolis
2016**

Aureanna Nairne Negrão Murakami

**EFEITO DA NANOFILTRAÇÃO E DA
MICROENCAPSULAÇÃO POR *SPRAY DRYING* NA
ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DO
EXTRATO AQUOSO DE *Ilex paraguariensis* A. ST. HIL.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Dias de Mello Castanho Amboni

**Florianópolis
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Murakami, Aureanna Nairne Negrão

Efeito da nanofiltração e da microencapsulação por Spray Drying na estabilidade dos compostos bioativos do extrato aquoso de *Ilex Paraguariensis* A. ST. HIL. / Aureanna Nairne Negrão Murakami ; orientadora, Prof^a. Dr^a. Renata Dias de Mello Castanho Amboni - Florianópolis, SC, 2016. 101 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação Multidisciplinar em Saúde.

Inclui referências

1. Saúde. 2. erva-mate, concentração. 3. compostos fenólicos, metilxantinas. 4. atividade antioxidante. 5. maltodextrina. I. Amboni, Prof^a. Dr^a. Renata Dias de Mello Castanho. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Saúde. III. Título.

**EFEITO DA NANOFILTRAÇÃO E DA MICROENCAPSULAÇÃO POR
SPRAY DRYING NA ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS
DO EXTRATO AQUOSO DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.**

Por

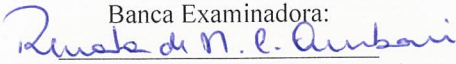
Aureanna Nairne Negrão Murakami

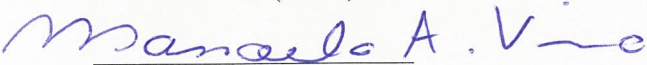
Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

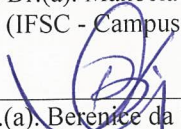
Florianópolis, 08 de julho de 2016

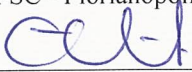
Prof. (a). Dr. (a). Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenador


Banca Examinadora:

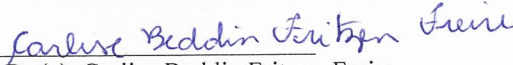

Prof.(a). Dr.(a). Renata Dias de Mello Castanho Amboni,
Orientador (UFSC)


Prof.(a). Dr.(a). Manoela Alano Vieira,
Membro (IFSC - Campus Xanxerê)


Prof.(a). Dr.(a). Berenice da Silva Junkes,
Membro (IFSC - Florianópolis)


Prof.(a). Dr.(a). Edna Regina Amante,
Membro (UFSC)


Prof.(a). Dr.(a). Elaine Schwinden Prudêncio,
Membro (UFSC)


Prof.(a). Dr.(a). Carlise Beddin Fritzen-Freire,
Membro (UFSC)

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos aos que contribuíram para a realização deste trabalho,

Aos meus pais, Anita (*in memoriam*) e Eduardo, aos quais devo minha educação e meus valores. Minha querida mãe, a qual me faz muita falta, lhe amarei eternamente. Aos meus irmãos, Alessandra, Jullya e Edison.

Ao meu marido, Fabio Seigi Murakami, pelo amor, carinho, companheirismo, incentivo e paciência em todos os momentos. Obrigada por ter me dado meu maior presente, meu filho Heitor Kenzo.

À Professora Dra. Renata Dias de Mello, minha orientadora, pela orientação, compreensão, dedicação, apoio e amizade. Um grande exemplo de profissional, mulher e mãe que levarei para a vida.

À Professora Dra. Elane Schwinden Prudêncio, pela valiosa colaboração, pelos ensinamentos, incentivo e por sempre ser tão prestativa.

À professora Dra. Edna Regina Amante, pelas brilhantes ideias, confiança e disposição em nos ajudar e nos ensinar.

Ao Professor Marcelo Maraschin, pelos ensinamentos, confiança e incentivo.

Aos ervateiros Jozeane Caldartt e Anselmo Zanelatto, pela confiança e disponibilização das amostras essenciais para a realização desse trabalho. Ao Sr. Dionísio, pessoa tão prestativa que me ajudou na coleta das minhas amostras.

Ao Professor Dr. José Carlos C. Petrus por disponibilizar seu laboratório e equipamentos indispensáveis para a materialização dessa pesquisa.

À Professora Miriam Salvador e toda sua equipe da Universidade de Caxias do Sul, as quais contribuíram para a realização das análises *in vivo*. Agradeço por terem sido tão atenciosas e prestativas.

A “família” do laboratório de Leites e Derivados, minhas amigas, em especial à Carlise Beddin Fritzen-Freire, Stephanie Silva Pinto, Graciele Nunes, agradeço imensamente por serem tão prestativas. Também à Ana Cristina Tanello, Ana Paula Prudêncio, Silvia Benedetti, Isabella Muñoz e Laura Zanotta. Muitas não fazem mais parte da equipe, mas deixaram grandes ensinamentos com suas passagens.

Ao laboratório de Frutas e Hortaliças, equipe que sempre me recebeu de braços abertos. Aos que já seguiram seus caminhos, Angela Rovarís, João Provesi, Cristiane M. Pagliosa, Manoela A. Vieira e Rossana Podestá.

Ao projeto FINEP/SEBRAE (Projeto Ervanova), pelo apoio financeiro para concretização desta pesquisa.

Ao PPGCAL, pela oportunidade e incentivo à pesquisa.

Aos Sérgio Souza, Sr. Bento e Sr. Carlos, sempre tão prestativos e simpáticos.

RESUMO

No extrato aquoso das folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) é encontrada uma grande variedade de compostos químicos com diversas atividades biológicas, com destaque para os compostos fenólicos, com reconhecida atividade antioxidante. Na primeira etapa deste estudo, a nanofiltração (NF) foi aplicada para concentrar os compostos bioativos do extrato aquoso de folhas de erva-mate. O impacto da NF na atividade antioxidante dos extratos foi avaliado através de análises *in vitro* pelo método DPPH e com células eucarióticas de *Saccharomyces cerevisiae*. Verificou-se que os teores de compostos fenólicos totais e de ácido clorogênico, de metilxantinas, taninos condensados, clorofila e saponinas, e a atividade antioxidante *in vitro* foram significativamente maiores no extrato concentrado quando comparado ao extrato inicial. Na segunda etapa, o extrato concentrado de erva-mate foi microencapsulado com maltodextrina com diferentes valores de dextrose equivalente (DE) por *spray drying*. O efeito dos diferentes DE de maltodextrina (10,2 (M10), 15,2 (M15) e 18,6 (M20)) foi avaliado em função do teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, rendimento dos compostos fenólicos microencapsulados, morfologia e tamanho de partícula, teor de umidade, atividade de água, dissolução, higroscopicidade, análise de cor e propriedades térmicas. A retenção dos compostos fenólicos, após a microencapsulação por *spray drying* e a estabilidade das microcápsulas a 5 °C, 25 °C e 45 °C, durante 90 dias, também, foram verificados. As microcápsulas produzidas com maltodextrina com menor valor de DE (M10) apresentaram o maior rendimento de encapsulação, além de melhores resultados para dissolução, higroscopicidade, teor de umidade e propriedades térmicas. Além disso, estas microcápsulas apresentaram melhor estabilidade em relação aos compostos fenólicos e atividade antioxidante durante armazenamento nas três temperaturas avaliadas.

Palavras-chave: erva-mate, concentração, compostos fenólicos, metilxantinas, atividade antioxidante, maltodextrina.

ABSTRACT

A wide variety of chemical compounds with different biological activities, especially phenolic compounds, is usually found in aqueous extract of yerba mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) and it is very important in science due this antioxidant activity. In the first step of this study, a nanofiltration technique (NF) was used to concentrate the bioactive compounds of the aqueous extract of yerba mate leaves. The impact of the NF in the antioxidant activity of the obtained extracts was evaluated using in vitro analysis such as DPPH and *Saccharomyces cerevisiae* eukaryotic cells. It was observed that the total phenolic compounds and chlorogenic acid, methylxanthines, tannins, chlorophyll, saponins, and the in vitro antioxidant activity was significantly higher in the concentrated extract when compared to the original extract. In the second step, the concentrated extract was microencapsulated using maltodextrin with different dextrose equivalent values (DE) applying spray drying process. The effect of different maltodextrin DE (10.2 (M10), 15.2 (M15) and 18.6 (M20)) was evaluated according to the content of phenolic compounds, antioxidant activity, yield of microencapsulated phenolics, morphology and particle size, moisture content, water activity, dissolution, hygroscopicity, color analysis and thermal properties. The retention of phenolic compounds after production of microcapsules and stability studies at 5 ° C, 25 ° C and 45 ° C for 90 days, were also investigated. The microcapsules produced with maltodextrin DE (M10) showed higher yield of encapsulation, and better results for dissolving, hygroscopicity, and moisture content and thermal properties. In addition, these microcapsules showed more stability when compared to the phenolics and antioxidant activity during different storage temperatures.

Keywords: yerba-mate, concentration, phenolic compounds, methylxanthines, antioxidant activity, maltodextrin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Folha de erva-mate.....	25
Figura 1.2 – Classificação das membranas quanto a sua seletividade..	32
Figura 1.3 – Representação da estrutura das microcápsulas (a) mononucleares e (b) multinucleares.....	34
Figura 1.4 – Diagrama esquemático do funcionamento de um <i>spray drying</i>	35
Figure 2.1 - Schematic diagram of the nanofiltration unit.	56
Figure 2.2 - Representative HPLC-DAD chromatogram of mate extract: (a) phenolic compounds with signal at 280 nm; and (b) methylxantines with signal at 272 nm; (1) Chlorogenic acid; (2) Theobromine; (3) Caffeine.....	62
Figura 3.1 – Micrografias dos pós secos em <i>spray drying</i> : (a) Controle (extrato concentrado de erva-mate por nanofiltração, CM, sem adição de maltodextrina); (b) M10 (CM com maltodextrina de DE 10,2); (c) M15 (CM com maltodextrina de DE 15,2) e (d) M20 (CM com maltodextrina de DE 18,6).	80
Figura 3.2 – Curva de DSC do controle e das microcápsulas. Controle (extrato concentrado de erva-mate por nanofiltração, CM, sem adição de maltodextrina); M10 (CM com maltodextrina de DE 10,2); M15 (CM com maltodextrina de DE 15,2) e M20 (CM com maltodextrina de DE 18,6).	82
Figura 3.3 - Estabilidade ao armazenamento dos compostos fenólicos (mg/mL ácido clorogênico) de extrato de erva-mate concentrado e microencapsulado em maltodextrinas de diferentes valores de DE, a 5 °C (a), 25 °C (b), 45 °C (c) durante 90 dias. (○) Controle (extrato concentrado de mate por nanofiltração, CM, sem adição de maltodextrina); (●) M10 (CM com maltodextrina de DE 10,2); (■) M15 (CM com maltodextrina de DE 15,2) e (▲) M20 (CM com maltodextrina de DE 18,6).	85
Figura 3.4 - Estabilidade ao armazenamento da atividade antioxidante (EC ₅₀ (µg/mL)) de extrato de erva-mate concentrado e microencapsulado em maltodextrinas de diferentes valores de DE, a 5 °C (a), 25 °C (b), 45 °C (c) durante 90 dias. (○) Controle (extrato concentrado de mate por nanofiltração, CM, sem adição de maltodextrina); (●) M10 (CM com maltodextrina de DE 10,2); (■) M15	

(CM com maltodextrina de DE 15,2) e (▲) M20 (CM com maltodextrina de DE 18,6).....85

LISTA DE TABELAS

Table 2.1 - Chemical compositions of the mate extract and of the concentrated mate extract.....	60
Table 2.2 - DPPH mean values for the concentrated and mate extracts analyzed and mean survival values of the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast treated with hydrogen peroxide (H ₂ O ₂) 75 mM in presence and absence of concentrated and mate extracts.....	64
Tabela 3.1 - Efeito do DE da maltodextrina no rendimento dos compostos fenólicos microencapsulados (RCFM), no teor de compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante das microcápsulas e do controle.....	77
Tabela 3.2 - Propriedades físico-químicas do controle e das microcápsulas com diferentes valores de DE de maltodextrina.	79
Tabela 3.3 - Resultados da análise de cor das microcápsulas e do controle.....	81
Tabela 3.4 - Resultados de DSC do Controle (extrato concentrado de erva-mate por nanofiltração, CM, sem adição de maltodextrina); M10 (CM com maltodextrina de DE 10,2); M15 (CM com maltodextrina de DE 15,2) e M20 (CM com maltodextrina de DE 18,6) apresentando o T _{pico} , T _{onset} e T _{endset} e entalpia (ΔH).	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2, azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
CAT	Enzimas catalases
CFS	Compostos fenólicos da superfície
CFT	Compostos fenólicos totais
CM	Extrato concentrado de erva-mate
Da	Dalton (g/mol)
DE	Dextrose equivalente
DMSO	Dimetil sulfoxido
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazila (Radical estável)
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EAC	Ácido clorogênico equivalente
EC50	Concentração eficiente para reduzir em 50 % a concentração inicial de DPPH
EO	Estresse oxidativo
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro
GPx	Glutathione peroxidase
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LDL	Lipoproteína de baixa-densidade
M10	Microcápsula contendo maltodextrina com DE 10,2
M15	Microcápsula contendo maltodextrina com DE 15,2
M20	Microcápsula contendo maltodextrina com DE 18,6
MM	Massa molar
MWCO	Massa molar de corte (<i>Molecular Weight Cut-off</i>)
NF	Nanofiltração
ORAC	Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio
PSM	Processo de separação com membranas

RCFM	Rendimento dos compostos fenólicos microencapsulados
SOD	Superóxido dismutase
Temp	Temperatura
TPC	<i>Total polyphenol content</i>
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
VRF	<i>Volumetric Reduction Factor</i>
YPD	Yeast Peptone Dextrose
ΔH	Entalpia

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
1.1 ERVA-MATE	25
1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ERVA-MATE	26
1.2.1 Atividade antioxidante	28
1.3 CONCENTRAÇÃO DE EXTRATOS DE ERVA-MATE	29
1.4 MICROENCAPSULAÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE CONCENTRADO.....	33
1.4.1 <i>Spray drying</i>	34
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO 2 - CONCENTRAÇÃO POR NANOFILTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DE <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i> A. ST. HIL.	51
1 INTRODUCTION.....	53
2 MATERIAL AND METHODS.....	54
2.1 CHEMICALS.....	54
2.2 PLANT MATERIAL	54
2.3 PREPARATION OF THE MATE EXTRACT	55
2.4 CONCENTRATION OF THE MATE EXTRACT	55
2.5 ANALYTICAL METHODS.....	56
2.5.1 Total phenolic content and chlorogenic acid.....	56
2.5.2 Methylxanthine compounds.....	57
2.5.3 Total saponins content.....	58
2.5.4 Condensed tannins content.....	58
2.5.5 Chlorophyll content.....	59
2.5.6 Antioxidant activity in vitro.....	59
2.5.7 Antioxidant activity (yeast assay)	59
2.6 STATISTICAL ANALYSIS	60
3 RESULTS AND DISCUSSION.....	60
4 CONCLUSIONS.....	65

REFERENCES.....	65
CAPÍTULO 3 - INFLUÊNCIA DE MALTODEXTRINAS COM DIFERENTES DE NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTABILIDADE DO EXTRATO CONCENTRADO DE ERVA-MATE (<i>ILEX PARAGUARIENSIS</i> A. ST. HIL) UTILIZANDO O PROCESSO DE <i>SPRAY DRYING</i>.....	69
1 INTRODUÇÃO.....	71
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	72
2.1 REAGENTES	72
2.2 PREPARO DAS FOLHAS	72
2.3 PREPARO DO EXTRATO	72
2.4 CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE POR NANOFILTRAÇÃO.....	73
2.5 PREPARO DAS MICROCÁPSULAS	73
2.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS.....	74
2.6.1 Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante	74
2.6.2 Rendimento dos compostos fenólicos microencapsulados.....	75
2.6.3 Teor de umidade, atividade de água e higroscopicidade	75
2.6.4 Morfologia e tamanho de partícula.....	75
2.6.5 Dissolução.....	76
2.6.6 Análise de cor	76
2.6.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	76
2.6.8 Estudo da estabilidade ao armazenamento.....	76
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	77
3.1 ANÁLISE DOS PÓS	77
3.2 ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO	83
4 CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS.....	89
CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
ANEXOS.....	95

ANEXO A – ARTIGO “CONCENTRATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS EXTRACTED FROM *ILEX PARAGUARIENSIS* ST. HIL. BY NANOFILTRATION” PUBLICADO NO “**FOOD CHEMISTRY**” (ISSN: 0308-8146) 95

ANEXO B – COMPROVANTE DO ENVIO DO ARTIGO INTITULADO “INFLUENCE OF DE-VALUE OF MALTODEXTRIN ON PHYSICOCHEMICAL, ANTIOXIDANT PROPERTIES, AND STORAGE STABILITY OF CONCENTRATED MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS* A. ST. HIL.) SPRAY DRIED” PARA A REVISTA LWT – FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY 101

INTRODUÇÃO

Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta nativa da América do Sul, que está sendo cada vez mais apreciada por outras regiões do mundo. Em suas folhas estão presentes uma diversidade de substâncias com atividade biológica conhecida, como por exemplo, os compostos fenólicos, que possuem capacidade antioxidante comprovada (ROCHA JR; MILOCA, 2007; BRACESCO et al., 2011; MURAKAMI et al., 2011; BOAVENTURA et al., 2013; FRIZON et al., 2015). A obtenção desses compostos para fins alimentícios é geralmente realizada pela extração aquosa e sua concentração possui grande vantagem para as indústrias desse ramo. No entanto, a técnica tradicional de concentração ocorre a altas temperaturas por prolongados tempos, sendo pouco eficiente na conservação desses compostos, já que são substâncias com características termolábeis (ANDREO; JORGE, 2006; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

A nanofiltração é um processo de separação por membranas com grande potencial para concentrar os compostos bioativos de extratos de plantas, pois não necessita da aplicação de altas temperaturas. Porém, esse processo gera um extrato concentrado, que pode favorecer a formação de produtos de complexação e oxidação durante o armazenamento, tanto por ação de enzimas, quanto por influência da presença de metais, luz e calor (MELLO; PETRUS; HUBINGER, 2010; Cissé et al., 2011).

Com a finalidade de superar essa limitação, a microencapsulação tem sido empregada para proteção dos compostos bioativos de extratos naturais concentrados (ÇAM; İÇYER; ERDOĞAN, 2014; PASRIJA et al., 2015; NUNES et al., 2015). Dentre as tecnologias de microencapsulação existentes, a mais utilizada pela indústria de alimentos é a de *spray-drying*, pois apresenta menor custo e alta capacidade de produção de cápsulas (DESAI; PARK, 2005).

Estudos têm mostrado que compostos bioativos, como os compostos fenólicos, podem ser protegidos por diferentes agentes encapsulantes no processo de microencapsulação por *spray drying* (ÇAM; İÇYER; ERDOĞAN, 2014; MISHRA; MISHRA; MAHANTA, 2014; PANG; YUSOFF; GIMBUN, 2014), com destaque para o uso da maltodextrina (ÇAM; İÇYER; ERDOĞAN, 2014; NUNES et al., 2015; CALISKAN; NURDIRIM, 2016).

A partir disto, o objetivo principal deste trabalho foi caracterizar e microencapsular, utilizando a técnica de *spray drying*, o extrato de erva-mate concentrado por nanofiltração.

A fim de contemplar todos os aspectos supracitados, esse trabalho está apresentado e estruturado da seguinte forma:

- (a)Capítulo 1 - **Revisão Bibliográfica**, abordando os principais temas envolvidos no trabalho: erva-mate, seus constituintes químicos, suas atividades biológicas, além da concentração e encapsulação do extrato de erva-mate, com enfoque especial sobre a nanofiltração e tecnologia de *spray drying*, respectivamente.
- (b)Capítulo 2 – **Concentração por nanofiltração de compostos bioativos extraídos da *Ilex paraguariensis* St. Hil.**, cujo objetivo foi caracterizar os compostos bioativos do extrato aquoso e do extrato concentrado de folhas de erva-mate, além de avaliar os efeitos da nanofiltração sobre os compostos bioativos e a atividade antioxidante *in vitro* e utilizando células eucariontes de *Saccharomyces cerevisiae*.
- (c)Capítulo 3 - **Influência dos valores de DE de maltodextrina nas propriedades físico-químicas, antioxidantes e estabilidade do extrato concentrado de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) utilizando o processo de *spray drying***, cujo objetivo foi encapsular o extrato concentrado de folhas de erva-mate por *spray drying* utilizando maltodextrinas com diferentes valores de DE, e avaliar as características físicas, químicas e morfológicas das microcápsulas.

O artigo publicado em revista indexada (Anexo A) está apresentado em anexo.

REFERÊNCIAS

- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes Naturais: Técnicas de Extração. **Boletim do CEPPA**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- BOAVENTURA, B. C. B.; MURAKAMI, A. N. N.; PRUDÊNCIO, E. S.; MARASCHIN, M.; MURAKAMI, F. S.; AMANTE, E. R., AMBONI, R. D. D. M. C. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, v.53, p. 686-692, 2013.
- BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378-384, 2011.
- CALISKAN, G.; NUR DIRIM, S. The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. **Powder Technology**, v.287, p. 308-314, 2016.
- CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2007. p. 519- 535.
- CISSÉ, M.; VAILLANT, F.; PALLET, D.; DORNIER, M. Selecting ultrafiltration and nanofiltration membranes to concentrate anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Food Research International**, v. 44, p. 2607-2614, 2011.
- ÇAM, M.; İCYER, N. C.; ERDOĞAN, F. Pomegranate peel phenolics: microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 117-123, 2014.
- DESAI, K. G. H.; PARK, J. H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p. 1361-1394, 2005.
- FRIZON, C. N. T.; OLIVEIRA, G. A.; PERUSSELLO, C. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; CAMLOFSKI, A. M. O.; ROSSA, U. B.; HOFFMANN-RIBANI, R. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared

spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 795-801, 2015.

MELLO, B.C.B.S., PETRUS, J. C. C., HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 533-539, 2010.

MISHRA, P.; MISHRA, S.; MAHANTA, C. L. Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, p. 252-258, 2014.

MURAKAMI, A. N. N.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; ZANOTTA, L.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C. C.; TEÓFILO, R. F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 2211-2216, 2011.

NUNES, G. L.; BOAVENTURA, B. C. B.; PINTO, S. S.; VERRUCK, S.; MURAKAMI, F. S.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60-68, 2015.

PANG, S. F.; YUSOFF, M. M.; GIMBUN, J. Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 159-165, 2014.

PASRIJA, D.; EXHILARASI, P. N.; INDRANI, D.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 289-296, 2015.

ROCHA JÚNIOR, W. F.; MILOCA, L. M. **Sistema Agroindustrial Ervateiro: perspectivas e debates**. Cascavel: Coluna do Saber, 2007. 206 p.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1ERVA-MATE

A espécie *Ilex paraguariensis* St. Hil. é popularmente conhecida como erva-mate. A altura da planta é variável; quando cultivada varia de 3-5 metros, porém, na floresta pode alcançar 25 metros de altura. A folha (Figura 1.1) é a parte da planta mais estudada e utilizada em desenvolvimento de produtos (DARTORA et al. 2011; FAGGION et al., 2016), apresenta coloração verde escura, possui característica alternada e mostra-se estreita na base e ligeiramente obtusa no vértice. Sua borda é provida de pequenos dentes, visíveis principalmente da metade do limbo para a extremidade (MAZUCHOWISKI, 1991).

Figura 1.1 – Folha de erva-mate.



Fonte: Heck e Mejia (2007).

A produção de erva-mate no Brasil marcou a história cultural de algumas regiões, podendo ser considerada como produto característico dos estados do Sul do Brasil, sendo consumida pelo público nativo dessa área diariamente sob a forma de chimarrão ou tererê, produtos preparados a partir das folhas e pequenos ramos. A cultura de utilização de erva-mate é antiga nessa região, tendo sido descoberta pelos índios e utilizada pelos colonizadores, representando uma expressão cultural forte nesses locais (MORAIS et al., 2009).

A erva-mate tem um papel importante não somente na cultura social, mas também na economia. De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2011, o volume de produção no Brasil chegou a 227.462 toneladas nos ervais nativos, representando aumento de 4,3 % em relação ao ano anterior (IBGE, 2011). A produção da erva-mate no Brasil em 2013 foi de 860 mil toneladas (IBGE, 2013). O estado de Santa Catarina é o terceiro maior produtor de erva-mate do Brasil, e foi responsável pela produção de 50.740 toneladas de erva-mate no ano de 2013, perdendo apenas para os estados do Paraná e Rio Grande do Sul (IBGE, 2013). A indústria tem demonstrado grande interesse na utilização dessa planta, não somente para comercialização de bebidas tradicionais, mas também como matéria prima de outros produtos alimentícios, farmacêuticos, cosméticos e de higiene (BRACESCO et al., 2011).

Em 2013 o Brasil exportou cerca de 100 toneladas em produtos de erva-mate, sendo os principais mercados o continente americano e europeu (IBGE, 2013). Em 2009, a Agência Brasileira de Promoção de Exportações e Investimentos (ApexBrasil) firmou uma parceria com a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Erva-Mate (Abimate) com o objetivo de aumentar a exportação dessa planta. A parceria não apenas incentiva a exportação dos produtos tradicionais, chimarrão e tererê, como também o desenvolvimento de novos produtos a base de erva-mate, com intuito de atrair o mercado internacional (ABIMATE, 2012).

1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ERVA-MATE

As investigações químicas relativas à composição da erva-mate foram iniciadas por Trommsdorff, em 1836, que constatou a presença de diversas substâncias resinosas, matéria corante e ácido tânico. Por sua vez, Stenhouse em 1843, detectou cafeína como seu principal alcalóide, relatando teores em torno de 0,13 % (VALDUGA, 1995).

A folha, além de ser a parte da planta mais utilizada para consumo humano, é também a parte mais estudada pelos pesquisadores. Dentre os principais compostos químicos já identificados nas folhas de erva-mate pode-se destacar os compostos fenólicos (ANESINE et al., 2012; BOAVENTURA et al., 2013; FRIZON et al., 2015); saponinas triterpênicas (SOUZA et al., 2011); metilxantinas (ANESINE et al., 2012; BOAVENTURA et al., 2013, BLUM-SILVA et al., 2015); taninos (MURAKAMI et al., 2013); carotenoides (VALDUGA, 1995);

clorofila (MALHEIROS, 2007; MURAKAMI et al., 2013), vitaminas (VALDUGA, 1995); componentes minerais (MURAKAMI et al., 2010) e compostos voláteis (ARAÚJO et al., 2007). A presença desses compostos é responsável por diversos efeitos biológicos conhecidos dessa planta (BRACESECO et al., 2011).

Trabalhos têm mostrado que a qualidade e o teor dos compostos químicos da erva-mate podem variar devido à influência de alguns fatores como: espécie, sazonalidade, idade da árvore e das folhas, clima, tempo de colheita, tipo de erva-mate (nativa ou cultivada), sistema de cultivo, solo, região produtora, processo de produção e estocagem (ESMELINDRO et al., 2002; STREIT et al., 2007; DARTORA, 2011).

A infusão de erva-mate é uma das formas de bebida que apresenta maiores quantidades de compostos fenólicos de interesse nutricional, como ácido caféico e seus derivados: ácido clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5- dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico e taninos (MEJIA et al., 2010; BOAVENTURA et al., 2013; MURAKAMI et al., 2013).

Inicialmente foram descritas 11 saponinas isoladas das folhas de *Ilex paraguariensis*, estabelecendo-se que as mesmas eram derivadas de glicosídeos do ácido ursólico e oleanólico (GOSMANN; SCHENKEL; SELIGMANN, 1989; GOSMANN et al. 1995) e, posteriormente, mais duas saponinas foram descritas (MARTINET et al., 2001). A presença desses compostos está relacionada com a propriedade hipocolesterolêmica da erva-mate (ARÇARI et al., 2011; BRAVO et al., 2014).

A presença das metilxantinas na erva-mate já é bem conhecida. A cafeína, metilxantina de maior quantidade no mate, foi isolada pela primeira vez em folhas de *Ilex paraguariensis* em 1843 por Stenhouse, a teobromina foi relatada por Oehrli em 1927, e a presença de teofilina foi descrita por Mazzafera (1994) em pequenas quantidades, enquanto que outros pesquisadores não detectaram sua presença (ANESINE et al., 2012). Acredita-se que a cafeína seja um dos estimulantes mais antigos da história humana. Santos et al. (2015) relacionaram os efeitos ansiolíticos, estimulantes e neuroprotetores da erva-mate com a presença da cafeína.

Segundo Malheiros (2007), a cor verde característica das folhas de erva-mate é atribuída pela forte presença de clorofila, sendo que sua intensidade tem relação direta com a concentração. Sendo assim, durante o processamento pode ocorrer a diminuição do nível de cor da clorofila. Durante o processamento térmico, a clorofila se degrada transformando em feofitina, mudando de cor verde brilhante a parda

oliva, dependendo da quantidade de ácido formado durante o processamento e armazenamento (SCHWARTZ; LORENZO, 1991).

Em contrapartida, na erva-mate foram encontrados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) formados durante a combustão incompleta de material orgânico em elevadas temperaturas, como por exemplo, a partir de veículos automotores, sistemas de aquecimento doméstico, atividades industriais, queima de plástico e fumaça de cigarro. Os HPAs fazem parte de uma classe de poluentes orgânicos, potencialmente tóxicos e cancerígenos (MENZIE; POTOCKI; SANTODONATO, 1992; VIEIRA, 2009).

1.2.1 Atividade antioxidante

Sabe-se que todos os organismos aeróbios necessitam de oxigênio para sua sobrevivência, porém o excesso de O_2 causa toxicidade aos mesmos, incluindo neurotoxicidade. Estes organismos produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) constantemente em condições fisiológicas. Dentre estas espécies estão os radicais livres (RLs), que são definidos como moléculas ou fragmentos moleculares com um ou mais elétrons desemparelhados (CHAVKO; AUKER; MCCARRON, 2003). Em condições normais, tais espécies não causam nenhuma toxicidade aos organismos, devido à presença de diferentes mecanismos de defesa antioxidante endógeno, composto por várias vitaminas e enzimas como, por exemplo, as enzimas catalases (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e as vitaminas A, C e E (HAYASHI, 2009).

Quando ocorre uma excessiva produção das espécies reativas, as defesas antioxidantes celulares não são suficientes para combatê-las e levam a uma condição denominada de estresse oxidativo (EO). De particular importância, o EO tem sido implicado na patogênese de várias doenças através de diferentes mecanismos, os quais podem envolver mutação no DNA, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica (FINKEL; HOLBROOK, 2000; VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007). Desta forma, existem muitas desordens metabólicas, como câncer e doenças neurodegenerativas, cuja patogênese tem sido relacionada ao estresse oxidativo (HALLIWELL, 2006).

Neste contexto, vários trabalhos têm sido realizados na busca de novos compostos com atividade antioxidante que tenham potencial para reverter o estresse oxidativo e assim, atuar na prevenção de uma série de doenças (DENARDIN et al., 2015; JIMÉNEZ, 2015). Dentre os estudos publicados, a erva-mate tem se apresentado como uma planta com

grande potencial antioxidante, devido principalmente à presença dos compostos fenólicos (ZIELINSKI et al., 2014). Porém, vale ressaltar que dados da literatura indicam que as propriedades farmacológicas de extratos brutos de plantas podem ser perdidas depois do isolamento de compostos específicos, indicando que parte de suas propriedades farmacológicas pode estar relacionada aos efeitos sinérgicos de diferentes classes de compostos presentes nestes extratos (CARLINI, 2003). Mejia et al. (2005), relacionaram a atividade antioxidante do mate com a inibição da proliferação de câncer oral. Já Gatto et al. (2015) relataram a possível prevenção da doença de Parkinson relacionada com o consumo do mate.

Os efeitos antioxidantes de uma substância são medidos indiretamente, pelos seus efeitos em um sistema ou substrato ou sistema biológico, onde tais efeitos possam ser monitorados. Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos de plantas, incluindo DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazila), ABTS (2,2, azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), FRAP (poder antioxidante de redução do ferro) e ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio) (DUDONNE et al., 2009). Dentre esses métodos, o DPPH, um radical livre estável, se destaca pela sua simplicidade e capacidade de avaliar a atividade antioxidante de produtos naturais, em condições de temperatura ambiente. O DPPH na presença de um antioxidante doador de hidrogênio pode ser reduzido em meio alcoólico. Quanto mais DPPH for reduzido maior a atividade antioxidante da solução testada (MOLYNEUX, 2004).

Ensaio *in vitro*, embora simples, não são necessariamente representativos das condições celulares do homem. O emprego de micro-organismos eucarióticos na avaliação da atividade antioxidante *in vivo* é um meio fácil, econômico e de alta reprodutibilidade, já que pode ser utilizado um grande número de células com as mesmas características genéticas. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é considerada um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudo de estresse oxidativo, pois seu metabolismo é semelhante ao de eucariontes superiores (RESNICK; COX, 2000; CANTERLE, 2005).

1.3 CONCENTRAÇÃO DE EXTRATOS DE ERVA-MATE

A concentração do extrato aquoso de erva-mate é uma alternativa para se adquirir extratos com maior potencial biológico. Porém, as técnicas tradicionais de concentração exigem o emprego de calor, que, por consequência, alteram compostos termolábeis, como os fenólicos. A

preservação desses compostos é de extrema importância para a manutenção da sua atividade biológica (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

Alguns trabalhos do nosso grupo de pesquisa têm sido realizados com objetivo de concentrar o extrato de erva-mate por diferentes técnicas. Murakami et al. (2011) e Prudêncio et al. (2012) obtiveram resultados satisfatórios na concentração de compostos bioativos utilizando a tecnologia de membranas para concentrar o extrato aquoso de folhas e cascas do resíduo da produção da erva-mate, respectivamente. Já Boaventura et al. (2013) utilizaram pioneiramente a técnica de crioc concentração para concentrar extrato aquoso de erva mate e verificaram um aumento no teor dos compostos bioativos.

O processo de separação com membranas (PSM) é uma operação unitária, que pode substituir alguns processos mais convencionais de separação e concentração. Uma das principais vantagens da filtração com membranas é o baixo consumo de energia, pois a mesma utiliza temperaturas mais amenas (STRATHMANN, 1990; ORDONEZ, 2005).

No início da década de 1970, o uso de membranas sintéticas como barreira seletiva surgiu como uma nova classe de processos de separação, em alternativa aos processos industriais clássicos, tais como destilação, filtração, absorção, centrifugação, concentração, dentre outros (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006). A partir dessa data, os processos de separação com membranas vêm se desenvolvendo rapidamente, sendo foco de pesquisas das indústrias químicas, farmacêuticas, biotecnológicas e de alimentos, como uma alternativa aos processos convencionais de separação (ADAMS; HURT; BARBANO, 2015; WANG et al., 2015; LIU, et al., 2016; . Esses processos são baseados no princípio da permeação seletiva de moléculas, permitindo, dessa forma, a passagem de certos componentes e retenção de outros presentes na solução (STRATHMANN, 1990).

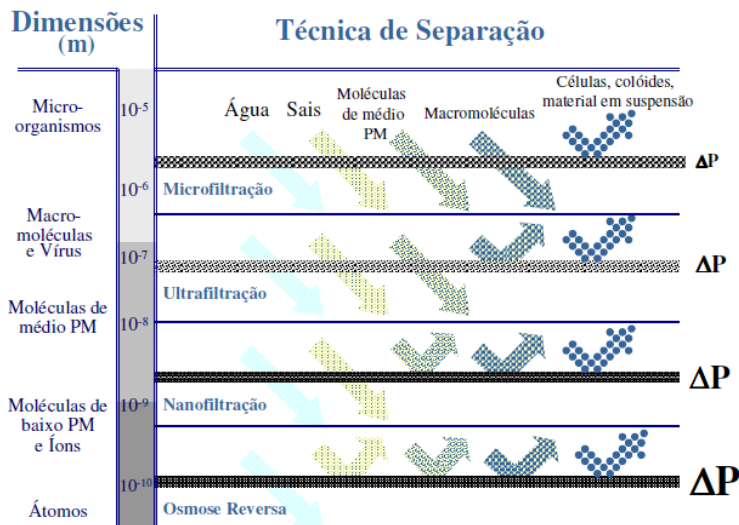
No PSM, normalmente ocorre um declínio do fluxo do permeado com o tempo. Esse declínio geralmente é resultado de alguns fenômenos decorrentes do processo, tais como a polarização por concentração, formação da camada gel polarizada e efeito *fouling* (MIRANDA, 2005). A partir do início do processo de filtração, ocorre um acúmulo de solutos próximo à superfície da membrana, por transporte convectivo, onde parte do solvente é removida do fluido, o que ocasiona uma maior concentração de solutos na superfície da membrana em relação à da solução. Esse aumento da concentração de solutos na superfície da membrana é conhecido como polarização por concentração e é responsável pela diferença observada entre o fluxo de permeado final e

inicial, comparando-se com o fluxo de água pura (SCHÄFER; FANE; WAITE, 2006).

O *fouling* da membrana resulta da penetração de solutos presentes em soluções de macromoléculas ou de suspensões coloidais na superfície interna dos poros da membrana e também da adsorção de moléculas no material da membrana, acarretando também uma diminuição no fluxo do solvente e alterando as características de retenção. Já a camada de gel ocorre quando na superfície da membrana há uma precipitação de macromoléculas. A formação da camada de gel ocasiona um prejuízo no funcionamento hidrodinâmico do sistema, pois constitui em mais uma barreira para o fluxo de permeação (DAUFIN et al., 2001; ALICIEO et al., 2007).

Dentre os PSM tem-se a microfiltração, a ultrafiltração, a nanofiltração e a osmose inversa, cujas principais diferenças são relativas ao tamanho médio dos poros da membrana e, conseqüentemente, à aplicação de diferentes parâmetros de operação, permitindo ou não a passagem de determinados componentes (Figura 1.2). À medida que o tamanho médio de poro da membrana diminui, torna-se necessário a aplicação de maiores pressões, para permitir a passagem de solução através da membrana, sendo utilizadas faixas entre 0,2 a 3,5 bar, para a microfiltração; 0,5 a 5,0 bar, para a ultrafiltração; 1,5 a 40 bar para a nanofiltração; e de 20 a 100 bar, para a osmose inversa (NOBREGA; BORGES; HARBERT, 2005).

Figura 1.2 – Classificação das membranas quanto a sua seletividade.



Fonte: Mierzwa et al. (2008).

A Nanofiltração (NF) é um processo compreendido entre a osmose reversa e a ultrafiltração. Tem a capacidade de separar e fracionar substâncias com baixa massa molar, possuindo diâmetro de poros correspondentes a uma faixa de 0,01 a 0,001 μm , sendo possível separar moléculas com massa molar de 100 a 1000 g/mol (Da) (NOBREGA; BORGES; HARBERT, 2005), faixa onde se localizam a grande maioria dos compostos com atividade biológica da erva-mate (HECK; MEJIA, 2007).

A aplicação da nanofiltração no ramo industrial vem aumentando, devido a sua alta capacidade de reter compostos com massa molar pequena, favorecendo, assim, a concentração de compostos bioativos, substâncias de grande interesse nas áreas alimentícia e farmacêutica. Mello, Petrus e Hubinger (2010) aumentaram a concentração de fenólicos e flavonóides, compostos com alta atividade antioxidante, no extrato aquoso e alcoólico de própolis. Segundo Cissé et al. (2011), a nanofiltração também foi eficiente na concentração de antocianinas do extrato de *Hibiscos sabdariffa* L., planta com interesse farmacêutico e nutricional pela atividade biológica proporcionada pelos seus constituintes. Prudêncio et al. (2012) obtiveram sucesso ao utilizar o

processo de nanofiltração para concentrar compostos fenólicos presentes na casca de resíduos gerados no campo.

1.4 MICROENCAPSULAÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE CONCENTRADO

A alta concentração de compostos presentes no extrato aquoso de erva-mate concentrado por nanofiltração favorece a oxidação do produto durante o armazenamento, tanto por ação de enzimas vegetais, quanto por influência de metais, da luz e do calor. Ainda, essa concentração favorece a formação de produtos de complexação, provável acometimento que pode vir a afetar as características do extrato concentrado. A tecnologia de encapsulação aparece como uma alternativa de grande potencial de preservação nutricional de produtos naturais (NEDOVIC et al., 2011; ÇAM; İÇYER; ERDOĞAN, 2014; PASRIJA et al., 2015), inclusive de extrato aquoso de erva-mate (HARRIS et al., 2011; NUNES et al., 2015).

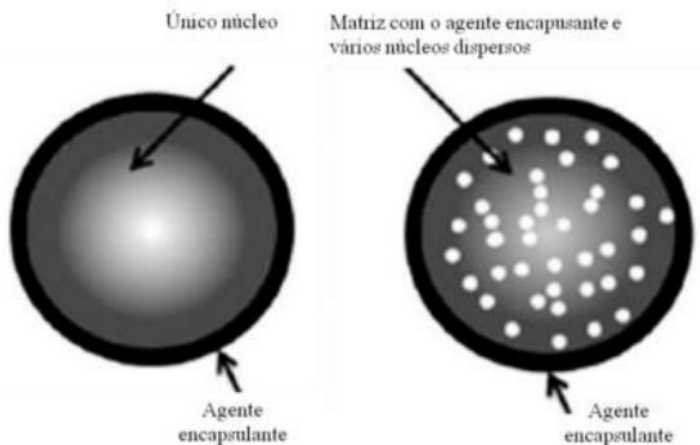
Dentro desse contexto, os processos de encapsulação se tornam cada vez mais importantes, e o crescente interesse por estes sistemas justifica-se devido ao seu potencial uso como carreadores de bioativos capazes de agregar a capacidade de liberá-los de forma efetiva e controlada. Além disso, a encapsulação constitui uma abordagem consagrada para preservação das propriedades físico-químicas dos bioativos, aumentando a vida útil do material. Os sistemas clássicos desenvolvidos em encapsulação constituem uma barreira físico-química contra elementos oxidantes como radicais livres, oxigênio ou radiação UV (RUKTANONCHAU et al., 2009; GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010).

A encapsulação é o processo de empacotamento de materiais sólidos, líquidos e gasosos em cápsulas extremamente pequenas, as quais podem liberar o conteúdo sob condições específicas. A estrutura externa (parede) da cápsula é uma forma de proteger o material interno contra a interação com o meio. O material utilizado nessa estrutura é o agente encapsulante, o qual deve ser selecionado de acordo com o produto que será encapsulado e com a característica do produto final desejado (NEDOVIC et al., 2011).

Nos métodos de microencapsulação, diferentes grupos morfológicos podem ser observados, sendo dois os mais comumente visualizados: (1) mononucleares, onde o material ativo fica concentrado próximo ao centro, rodeado pelo agente encapsulante ou, (2) multinucleares, onde o agente encapsulante forma uma rede

tridimensional com vários materiais ativos que podem estar adsorvidos, incorporados ou ligados covalentemente à matriz (Figura 1.3) (FANG; BHANDARI, 2010).

Figura 1.3 – Representação da estrutura das microcápsulas (a) mononucleares e (b) multinucleares.



Fonte: Burgain et al. (2011).

Diversos métodos (químicos, físicos, ou físico-químicos) podem ser utilizados para encapsular compostos ativos (Tabela 1.1). A diferença entre eles está principalmente no envolvimento ou aprisionamento do material a encapsular pelo agente encapsulante. Dessa forma, devem ser consideradas as propriedades físico-químicas do material a encapsular e do agente encapsulante, a aplicação e finalidade, o tamanho, textura e forma das microcápsulas, bem como o mecanismo de liberação do material a ser encapsulado (BANSODE et al., 2010). Deste modo, o método de microencapsulação deve ser simples, reproduzível, rápido e fácil de adaptar para a escala industrial (SILVA et al., 2003).

1.4.1 *Spray drying*

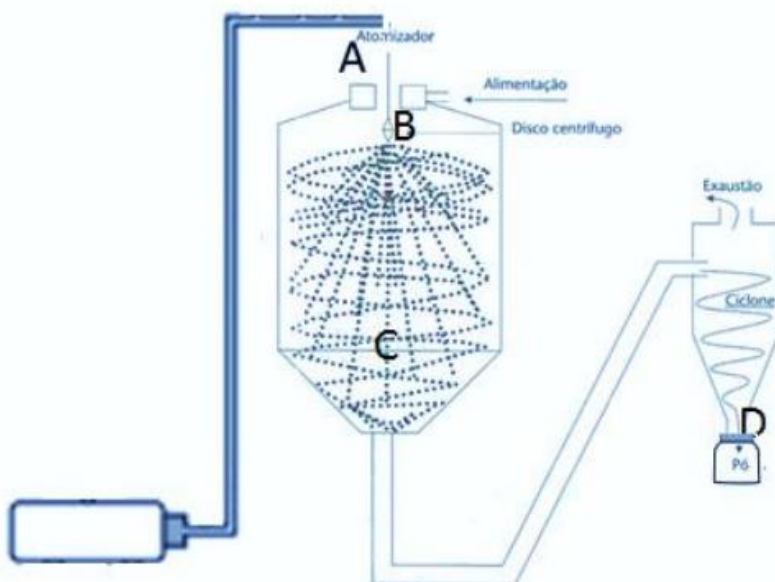
A secagem por atomização com a utilização do *spray drying* vem sendo utilizada há décadas, sendo que as primeiras descrições datam de 1860, com oficialização da primeira patente já no ano de 1872. A atomização é uma técnica relativamente barata e um dos métodos de

encapsulação mais antigos, tendo sido utilizada já na década de 30 na preparação dos primeiros compostos encapsulados (DZIEZAK, 1988).

O método consiste na transformação de um material em estado líquido, na forma de soluções, emulsões e suspensões, para o estado sólido, formando pós finos e secos. A secagem é feita em operação contínua através de meio aquecido (MASTERS, 1985).

A Figura 1.4 mostra, de forma esquemática, o processo de secagem por *spray drying*. O método consiste basicamente na atomização de uma mistura sólido-fluido que é submetida a um fluxo de ar quente (co-corrente, contracorrente ou misto) na câmara de secagem, promovendo assim a evaporação do solvente e levando a formação de um produto seco (SOUZA; SOUZA NETO; MAIA, 2003). As partículas sólidas secas são então separadas por um ciclone e recolhidas na forma de um pó.

Figura 1.4 – Diagrama esquemático do funcionamento de um *spray drying*.



Fonte: Adaptado de Pessoa, Júnior e Kilikian (2005).

O equipamento possui um sistema de bombeamento, por onde a suspensão é aspirada até a região A, onde há um sistema de aquecimento do ar de entrada. Localizado na região B existe um bocal (bico

atomizador), que possui saída para a suspensão e o ar. A atomização é iniciada quando a suspensão, sob efeito da compressão do gás, entra pelo pequeno orifício do bico atomizador, formando pequenas gotículas. Este representa um dos pontos críticos do processo, já que o tamanho da gota formada determina o tamanho da partícula. A atomização é realizada usando-se um sistema centrífugo ou de alta pressão, e as gotículas atomizadas imediatamente entram em contato com um fluxo de ar quente na câmara de secagem (C), transformando-se em partículas sólidas (MAFART, 1994). Pela formação de um sistema de sucção o gás movimenta-se de forma circular, formando um movimento de ciclone que encaminha as partículas secas para o recipiente coletor (D).

A atomização envolve a geração de um grande número de gotículas a partir de um fluido, resultando no aumento na relação área/volume e permitindo uma rápida remoção da umidade (LEFEBVRE, 1989). Aumentando-se a área superficial entre a gota e o meio de secagem, o tempo de exposição das partículas ao calor é curto, fazendo com que a temperatura do núcleo não ultrapasse 100 °C. Quando o ar quente entra em contato com a partícula úmida, ocorre a desidratação quase que instantânea da gotícula. Além disso, o aquecimento e a transferência de massa durante o processo de secagem ocorrem ao redor das gotículas formadas, criando uma proteção de vapor ao redor destas. Devido a estes fatores, esta técnica pode ser empregada em produtos termosensíveis (LANNES; MEDEIROS, 2003; OAKLEY, 1997; DZIEZAK, 1988; DAIUTO; CEREDA, 2003).

Estudos têm mostrado que compostos bioativos, como os compostos fenólicos, podem ser protegidos por diferentes agentes encapsulantes no processo de microencapsulação por *spray drying* (ÇAM; ICYER; ERDOGAN, 2014; MISHRA; MISHRA; MAHANTA, 2014; PANG; YUSOFF; GIMBUN, 2014). Uma grande variedade de materiais utilizados como agente encapsulante está disponível no mercado, no entanto, as escolhas mais frequentes estão entre os amidos modificados, as maltodextrinas, as gomas, as proteínas e os açúcares. A seleção do agente depende muito da composição química do material a encapsular, do método de encapsulamento, das características desejadas da encapsulação e da sua aplicação industrial (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

De acordo com Desai e Park (2005) e Sanguansri e Augustin (2006), um agente encapsulante ideal deve possuir as seguintes características:

- boas propriedades reológicas, que se traduz em uma baixa viscosidade, de modo a facilitar o processo de encapsulamento;
- fácil manuseio;
- boa capacidade para emulsionar as partículas e estabilizar a emulsão produzida;
- não ser reativo com o material a ser encapsulado tanto durante o processo como no armazenamento;
- capacidade para manter o material na sua estrutura durante o processamento e armazenamento;
- capacidade para liberar completamente o material a ser encapsulado;
- capacidade de proteger o material encapsulado contra oxidação, calor, luz e umidade;
- solubilidade em solventes usados na indústria alimentar.

Entre os diversos agentes encapsulantes já utilizados para microencapsular o extrato de erva-mate podem ser citados a sacarose, soluções de alginato de sódio e quitosana, soluções de alginato de sódio e amido de milho e alginato de cálcio (LÓPEZ-CORDOBA; DELADINO; MARTINO, 2013; LÓPEZ-CORDOBA et al., 2014; DELADINO; NAVARRO; MARTINO, 2013; LÓPEZ-CORDOBA; DELADINO; MARTINO, 2014). No entanto, pelo método de *spray drying*, a utilização de maltodextrina vem se destacando por mostrar maior eficiência na proteção de compostos fenólicos (WU et al., 2014; PANG; YUSOFF; GIMBUM, 2014; NUNES et al., 2015).

A maltodextrina não é apenas o material mais usado nessa tecnologia, como também é o agente mais aplicado com a finalidade de preservar a oxidação de compostos fenólicos (GHARSALLAOUI et al., 2007; LAINE et al., 2008; SAÉNZ et al., 2009; NUNES et al., 2015). A maltodextrina é um hidrolisado de amido que consiste em unidades de glucose unidas principalmente por ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4). São produzidas industrialmente por hidrólise ácida ou enzimática, ou a combinação de ambas, principalmente do amido de milho. Diferentemente do amido nativo, a maltodextrina é solúvel em água (CHRONAKIS, 1998). Pode ser diferenciada pelo valor de dextrose equivalente (DE), que reflete o seu poder redutor, sendo expresso em gramas de glucose por 100 g de maltodextrina. Características como a

solubilidade, higroscopicidade, gosto doce e compressibilidade aumentam com o valor de DE (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

No processo de microencapsulação de ingredientes alimentícios, maltodextrinas têm sido extensivamente utilizadas por apresentarem habilidade na proteção dos materiais encapsulados contra oxidação, sendo este fato atribuído à sua capacidade de formar filmes, às suas propriedades plásticas e ao seu poder redutor (QI; XU, 1999; ELNAGGAR et al., 2010). Outro fator importante está relacionado às suas propriedades físico-químicas e ao seu baixo custo de aquisição (CHRONAKIS, 1998; KILMARTIN; REID; SAMSON, 2004).

Maltodextrina com valores de dextrose equivalente (DE) entre 10 e 20 é amplamente utilizada para encapsular compostos sensíveis a oxidação, como por exemplo os compostos fenólicos. Caliskan e Nur Dirim (2016) avaliaram o efeito de diferentes métodos de secagem e de quantidades de maltodextrina como agente encapsulante de extratos de *Rhus genus*. Em outro estudo, Çam, Içyer e Erdogan (2014) utilizaram maltodextrina com DE de 15 e de 20 na microencapsulação para preservar os compostos fenólicos presentes na casca de romã. Pang, Yusoff e Gimbum (2014) utilizaram a maltodextrina DE 10 para a preservação dos compostos fenólicos do chá de *Orthosiphon stamineus*.

Considerando a sensibilidade dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de erva-mate concentrado por nanofiltração frente à presença de oxigênio e luz, a utilização da maltodextrina como agente encapsulante e protetor no processo de microencapsulação por *spray drying* aparece como alternativa de grande potencial para a preservação desses compostos.

REFERÊNCIAS

ABIMATE – Associação Brasileira de Industrias Exportadoras de Ervamate. **Projeto Setorial Integrado – Exportações** – 2012. Disponível em: <<http://www.abimate.org.br/>>. Acesso em: 10 de junho 2015.

ADAMS, M. C.; HURT, E. E.; BARBANO, D. M. Effect of soluble calcium and lactose on limiting flux and serum protein removal during skim milk microfiltration. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 7483-7497, 2015.

ALICIEO, T. V. R.; MENDES, E. S.; PEREIRA, N. C.; BARROS, S. T. D.; ALVES, J. A. Avaliação do fouling na microfiltração de cerveja – estudo das resistências. **Acta Science Technology**, v. 29, n. 2, p. 151-156, 2007.

ANESINE, C.; TURNER, S.; COGOI, L.; FILIP, R. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT – Food Science and Technology**, v. 45, p. 299-304, 2012.

ARAÚJO, H. C.; LACERDA, M. E. G.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; KAPLAN, M. A. C. Studies on the aroma of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) using headspace solid-phase microextraction. **Phytochemical Analysis**, v. 18, p. 469-474, 2007.

ARÇARI, D. P.; PORTO, V. B.; RODRIGUES, E. R. V.; MARTINS, F.; LIMA, R. J.; SAWAYA, A. C. H. F.; RIBEIRO, M. L.; CARVALHO, P. O. Effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) supplementation on oxidative stress biomarkers and LDL oxidisability in normo- and hyperlipidaemic humans. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 190-197, 2011.

BANSODE, S. S.; BANARJEE, S. K.; GAIKWAD, D. D.; JADHAV, S. L.; THORAT, R. M. Microencapsulation: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 1, n. 2, p. 38-43, 2010.

BLUM-SILVA, C. H.; CHAVES, V. C.; SCHENKEL, E. P.; COELHO, G. C.; REGINATTO, F. H. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex Paraguariensis* aqueous extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 1-6, 2015.

BOAVENTURA, B. C. B.; MURAKAMI, A. N. N.; PRUDÊNCIO, E. S.; MARASCHIN, M.; MURAKAMI, F. S.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex Paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, v. 53, p. 686-692, 2013.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378-384, 2011.

BRAVO, L.; MATEOS, R.; SARRIÁ, B.; BAEZA, G.; LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. **Fitoterapia**, v. 92, p. 219-229, 2014.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467-483, 2011.

ÇAM, M.; İCYER, N. C.; ERDOĞAN, F. Pomegranate peel phenolics: microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 117-123, 2014.

CALISKAN, G.; NUR DIRIM, S. The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. **Powder Technology**, v.287, p. 308-314, 2016.

CANTERLE, L. P. **Erva-mate e atividade antioxidante**. 2005. 99 f. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemical Behaviour**, v. 75, p. 501-512, 2003.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2007. p. 519- 535.

CISSE, M.; VAILLANT, F.; PALLET, D.; DORNIER, M. Selecting ultrafiltration and nanofiltration membranes to concentrate anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Food Research International**, v. 44, p. 2607-2614, 2011.

CHAVKO, M; AUKER, C. R.; MCCARRON, R. M. Relationship between protein nitration and oxidation and development of hyperoxic seizures. **Nitric Oxide**, v. 9, p. 18-23, 2003.

CHRONAKIS, I.S. On the molecular characteristics, compositional properties and structural-functional mechanisms of maltodextrins: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, p. 599-673, 1998.

DAIUTO, E. R.; CEREDA, M. P. **Amido como suporte na desidratação por atomização e em microencapsulamento**. In: Cereda MP, Vilpoux OF. (Coord). Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas sul americanas. São Paulo: Fundação Cargill. p.449-75, 2003.

DARTORA, N.; SOUZA, L. M.; SANTANA-FILHO, A. P.; LACOMINI, M.; VALDUGA, A. T.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1453-1461, 2011.

DAUFIN, G.; ESCUDIER, J. P.; CARRERE, H.; BEROT, S.; FILLAUDEAU, L.; DECLOUX, M. Recent and emerging applications of membrane processes in the food and dairy industry. **Trans IChemE**, v. 79, p. 89-102, 2001.

DELADINO, L.; NAVARRO, A. S.; MARTINO, M. N. Carrier systems for yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) to enrich instant soups. Release mechanisms under different pH conditions. **LWT – Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 163-169, 2013.

DENARDIN, C. C.; HIRSCH, G. E. ROCHA, R. F.; VIZZOLTTO, M.; HENRIQUES, A. T., MOREIRA, J. C. F.; GUMA, F. T. C. R.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p. 387-398, 2015.

DESAI, K. G. H.; PARK, J. H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p. 1361-1394, 2005.

DUDONNE, S.; VITRAC, X.; COUTIERE, P.; WOILLEZ, M.; MERILLON, J. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1768-1774, 2009.

DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and Encapsulated Ingredients. **Food technology**, p. 136-151, 1988.

ELNAGGAR, Y.S.R. EL-MASSIK, A.M. ABDALLAH O.Y. EBIAN, A.E.R. Maltodextrin: a novel excipient used in sugar-based orally disintegrating tablets and phase transition process. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.11 p. 645-651, 2010.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da yerba-mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 199-204, 2002.

FAGGION, H.; BENINCÁ, C.; VOLL, F. A. P.; ZANOELO, E. F. Phase equilibrium diagrams for the system water, inert and solutes from mate (*Ilex paraguariensis*) leaves at constant temperature and cyclic pressurization. **Journal of Food Engineering**, v. 169, p. 79-84, 2016.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510-523, 2010.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FRIZON, C. N. T.; OLIVEIRA, G. A.; PERUSSELLO, C. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; CAMLOFSKI, A. M. O.; ROSSA, U. B.; HOFFMANN-RIBANI, R. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 795-801, 2015.

GATTO, E. M.; MELCON, C.; PARISINI, V. L.; BARTOLONI, L.; GONZALEZ, C. D. Inverse association between yerba mate consumption and idiopathic Parkinson's disease. A case-control study. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 356, p. 163-167, 2015.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREI, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, v. 146, p. 276-290, 2010.

GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Triterpenoids saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 438-441, 1995.

GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; SELIGMANN, O. A new saponin from mate, *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 1367-1370, 1989.

HABERT, A., C; BORGES, C.P.; NÓBREGA, R. **Processos de Separação com Membranas**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006. 180p.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemical**, v. 97, p. 1634-1658, 2006.

HARRIS, R.; LECUMBERRI, E.; MATEOS-APARICIO, I.; MENGIBAR, M.; HERAS, A. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 803-806, 2011.

HAYASHI, M. Oxidative stress in development brain disorders. **Neuropathology**, v. 29, p. 1-8, 2009.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA 2011**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 18 nov 2015.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Comentários. Produção da Extração Vegetal e Sivilcultura – Base 2013**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2013/comentario.pdf>>. Acesso em: 10 de junho de 2015.

JIMENÉZ, N.; CARRILLO-HORMAZA, L.; PUJOL, A.; ALZATE, F.; OSORIO, E.; LARA-GUZMAN, O. Antioxidant capacity and phenolic content of commonly used anti-inflammatory medicinal plants in Colombia. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 272-279, 2015.

KILMARTIN, P.A.; REID, D.S.; SAMSON, I. Dielectric properties of frozen maltodextrin solutions with added NaCl across the glass transition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, p. 1277–1284, 2004.

LAINE, P.; KYLLI, P.; HEINONEN, M. JOUPPIA, K. Storage Stability of microencapsulated clouberly (*Rubus chamaemorus*) phenolics. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 11251-11261, 2008.

LANNES, S. C. S; MEDEIROS, M. L. **Processamento de achocolatado de cupuaçu por spray-dryer**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences v. 39, 2003.

LEFEBVRE, A.H., **Atomization and Sprays**. CRC Press, New York, 1989.

LIU, J.; YUAN, J.; JI, Z.; WANG, B.; HAO, Y.; GUO, X. Concentrating brine from seawater desalination process by nanofiltration-electrodialysis integrated membrane technology. **Desalination**, v. 390, p. 53-61, 2016.

LOPÉZ-CORDOBA, A.; DELADINO, L.; AGUDELO-MESA, L.; MARTINO, M. Yerba mate antioxidant powders obtained by cocrystallization: Stability during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 158-165, 2014.

LÓPEZ-CORDOBA, A.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 5, p. 315-323, 2013.

LÓPEZ-CORDOBA, A.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Release of yerba mate antioxidants from com starch-alginate capsules as affected by structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, n. 2, p. 150-157, 2014.

MAFART, P. **Ingenieria industrial alimentaria**. Zaragoza, Ed. Acibia, 1994.

MALHEIROS, G. C. **Estudo da alteração da cor e degradação da clorofila durante armazenagem de erva-mate tipo chimarrão**. 2007, 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) –

Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

MARTINET, A. et al. NMR and LC-MSn characterization of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemical analysis: PCA**, v. 12, p.48-52, 2001.

MASTERS, K. **Analytical methods and properties of dried dairy products**. In R. Hansen (Ed.), Evaporation, membrane filtration and spray drying in milk powder and cheese production Vanlose, Denmark: North European Dairy Journal, p. 393–403, 1985.

MAZUCHOWISKI, J. Z. **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill)**. 2^a ed. Curitiba: EMATER, 1991. 104 p.

MAZZAFERA, P. Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 6, p. 149– 151, 1994.

MEJIA, E. G.; YOUNG, S. S.; RAMIREZ-MARES, M. V.; KOBAYASHI, H. Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea on Topoisomerase Inhibition and Oral Carcinoma Cell Proliferation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 1966-1973, 2005.

MEJIA, E. G.; SONG, Y. S.; HECK, C. I.; RAMIREZ-MARES, M. V. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 23-34, 2010.

MELLO, B.C.B.S., PETRUS, J. C. C., HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 533-539, 2010.

MENZIE, C. A.; POTOCKI, B. B.; SANTODONATO, J. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment **Environmental Science and Technology**, v. 26, p. 1728, 1992.

MIERZWA, J.C.; SILVA, M.C.C. da.; RODRIGUES, L.D.B.; HESPANHOL, C. Tratamento de água para abastecimento público por ultrafiltração: avaliação comparativa através dos custos diretos de implantação e operação com os sistemas convencional e convencional com carvão ativado. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.78, n.13, p. 78- 87, 2008.

MIRANDA, K. F. **Estudo da concentração de licopeno por ultrafiltração a partir de suco de melancia (*Citrullus vulgaris* Schard).** 2005. 149 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MISHRA, P.; MISHRA, S.; MAHANTA, C. L. Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. **Food and bioproducts processing**, v. 92, p. 252-258, 2014.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakar Journal Science Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MORAIS, E. C.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G. A.; BOAVENTURA, B. C. B.; ANDRADE, F.; WASLAWIK, E.; DIPIETRO, P. F.; MARASCHIN, M.; SILVA, E. L. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8316-8324, 2009.

MURAKAMI, A. N. N. M. **Concentração de compostos fenólicos de extrato aquoso de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.).** 2010, 130f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MURAKAMI, N. N. M.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; ZANOTTA, L. M.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C. C.; TEÓFILO, R. F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) extract through nanofiltration. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 2211-2216, 2011.

MURAKAMI, A. N. N.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; BOAVENTURA, B. C. B.; MUNOZ, I. B.; BRANCO, C. S.; SALVADOR, M.; MARASCHIN, M. Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration. **Food Chemistry**, v. 141, p. 60-65, 2013.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Precedia Food Science**, v. 1, p. 1806-1815, 2011.

NOBREGA, R.; BORGES, C. P.; HARBERT, A. C. Processo de Separação por Membranas. In: PESSOA JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. 444 p.

NUNES, G. L.; BOAVENTURA, B. C. B.; PINTO, S. S.; VERRUCK, S.; MURAKAMI, F. S.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60-68, 2015.

OAKLEY, D.R. **Produce uniform particles by spray-drying**. Chemical engineering progress, p. 48-54, October, 1997.

ORDONEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos – Componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, v. I, 2005.

PANG, S. F.; YUSOFF, M. M.; GIMBUN, J. Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 159-165, 2014.

PASRIJA, D.; EXHILARASI, P. N.; INDRANI, D.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 289-296, 2015.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. 440 p.

PRUDÊNCIO, A. P. A.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C.; MURAKAMI, A. N. N.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C. C.; OGLIARI, P. J. LEITE, R. S. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 399-405, 2012.

QI, Z.H.; XU, A. Starch-based ingredients for flavor encapsulation. **Cereal Foods World**, v.44, p. 460-465, 1999.

RESNICK, M. A.; COX, B. S. Yeast as an honorary mammal. **Mutation Research**, v. 451, p. 1-11, 2000.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. London, Pharmaceutical Press, 2006.

RUKTANONCHAU, U.; SAKULHU, U.; BEJRAPHA, P.; OPANASOPIT, P.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; JUNYAPRASERT, V.; PUTTIIPATKHACHORN, S. Effect of lipid types on physicochemical characteristics, stability and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded lipid nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, p. 614-626, 2009.

SÁENZ, C.; TAPIA, S.; CHÁVEZ, J.; ROBERT, P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). **Food chemistry**, v. 114, p. 616-622, 2009.

SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M. A.; Nanoscale materials development – a food industry perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 547-556, 2006.

SANTOS, E. C. S.; BICCA, M. A.; BLUM-SILVA, C. H.; COSTA, A. P. R.; SANTOS, A. A.; SHENKEL, E. P.; FARINA, M.; REGINATTO, F. H.; LIMA, T. C. M. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. **Neuroscience**, v. 292, p. 13-21, 2015.

SCHÄFER, A.I.; FANE, A.G; WAITE, T.D. **Nanofiltration – Principles and Applications**. Great Britain: Elsevier, 2006. 318 p.

SCHWARTZ, S. J.; LORENZO, T. V. Chlorophyll stability during continuous aseptic processing and storage. **Journal of Food Science**, v. 56, p. 1059-1062, 1991.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de proteínas e peptídeos: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 1, p. 1-9, 2003.

SOUZA, P. H.M.; SOUZA NETO, M, H.; MAIA, G. A. **Componentes funcionais nos alimentos**. Boletim da SBCTA.v. 37, n. 2, p.127-135, 2003.

SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; SCOPARO, C. T.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J.; LACOMINI, M.; SASSAKI, G. L. Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: Development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7307-7315, 2011.

STRATHMANN, H. Synthetic membranes and their preparation. In: PORTER, M.C. **Handbook of Industrial Membrane Technology**. New Jersey: Noyes Publications, 1990. p. 1-60.

STREIT, N. M.; HECKTHEUER, L. H. R.; CANTO, M. W.; MALLMANN, C. A.; STRECK, L.; PARODI, T. V.; CANTERLE, L. P. Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Chemistry**, v. 102, p. 560-564, 2007.

VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguariensis* Saint Hilarie e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate**. 1995, 119 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MANCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemical Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemical Biology Interactivity**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VIEIRA, M. A. **Análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpas) nas etapas do processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e caracterização química dos resíduos da trituração para o desenvolvimento de produto**. 2009, 246. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

WANG, Y.; ZHU, J.; HUANG, H.; CHO, H. Carbon nanotube composite membranes for microfiltration of pharmaceuticals and personal care products: capabilities and potential mechanisms. **Journal of Membrane Science**, v. 479, p. 165-174, 2015.

WU, Y.; ZOU, L.; MAO, J.; LIU, S. Stability and encapsulation efficiency of sulforaphane microencapsulated by spray drying. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 15, p. 497-503, 2014.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M.; GRANATO, D. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of

different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246-254, 2014.

CAPÍTULO 2 - CONCENTRAÇÃO POR NANOFILTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DE *ILEX PARAGUARIENSIS* A. ST. HIL.

Artigo publicado:

MURAKAMI, A.N.N.; AMBONI, R.D.M.C.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMANTE, E.R.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; BOAVENTURA, B.C.B.; MUÑOZ, I.B.; BRANCO, C.S.; SALVADOR, M.; MARASCHIN, M. Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. by nanofiltration. **Food Chemistry**, v. 141, p. 60-65, 2013.

Concentração por nanofiltração de compostos biologicamente ativos extraídos das folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

RESUMO

O principal objetivo desse estudo foi caracterizar os compostos com atividades biológicas presentes no extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) e no extrato concentrado de erva-mate obtido por nanofiltração (NF). O impacto da NF na atividade antioxidante de ambos os extratos também foi avaliado, através de análises *in vitro* com células eucarióticas de *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados mostraram um aumento significativo no teor de compostos fenólicos (337,69 %), ácido clorogênico (483,45 %), teobromina (322,72 %), cafeína (250,70 %), clorofila (320,84 %), taninos condensados (277,75 %) e saponinas (211,01 %) no extrato concentrado. O extrato de erva-mate concentrado apresentou maior atividade antioxidante *in vitro* comparado ao extrato de erva-mate. De acordo com os resultados obtidos, podemos afirmar que a nanofiltração é um método válido para concentrar compostos com atividade biológica de extrato aquoso de erva-mate.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*; compostos bioativos; extrato aquoso; atividade antioxidante; concentração; nanofiltração.

Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. by nanofiltration

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the bioactive compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) extract and in concentrated mate extract obtained by nanofiltration (NF). Also, the impact of NF on the antioxidant activity of both mate extracts was evaluated *in vitro* and using eukaryotic cells of *Saccharomyces cerevisiae* (yeast assay). The results showed a significant increase in the contents of total phenolic (337.69 %), chlorogenic acid (483.45 %), theobromine (322.72 %), caffeine (250.70 %), chlorophyll (320.84 %), condensed tannins (277.75 %) and saponins (211.01 %) in the concentrated mate extract. The concentrated mate extract showed higher *in vitro* antioxidant activity than the mate extract. According to the results obtained, it can be stated that the use of nanofiltration membrane is a valid approach for the concentration of biologically active compounds in aqueous extract of mate.

Keywords: *Ilex paraguariensis*; bioactive compounds; aqueous extract; antioxidant activity; concentration; nanofiltration.

1 INTRODUCTION

The *Ilex paraguariensis* St. Hil., more commonly known as yerba-mate or mate, is a plant that is native from the subtropical region of South America and is widely consumed and produced in southern Brazil, Argentina, Uruguay and Paraguay. In these countries, the infusion or decoction of the aerial parts of mate is widely used to make different beverages such as *chimarrão* and *tererê*, which are consumed in amounts of more than one liter per day by millions of people and are also the main alternative to coffee and tea (MORAIS et al., 2009). This plant is very rich in different biologically active compounds such as phenols, methylxanthines, triterpene saponins, flavonoids, minerals, and others. It is widely used in folk medicine because of its many health promoting effects, such as anti-inflammatory, anti-obesity and anti-cancer, and mainly antioxidant activity (HECK; MEJIA, 2007).

Concentration of the biologically active compounds present in mate is generally performed by solid-liquid extraction, which promotes a significant dilution. The occurrence of such dilution is attributable to several factors, such as limited quantity of solid content and overall nutritional composition, which can vary according to the different regions and times of harvesting, among other factors. Besides, the traditional approaches used for concentrating biologically active compounds from natural products include simple steam-and-vacuum distillation, which generally requires high temperature and high energy consumption. These methods may result in nutritional loss caused by the instability of bioactive compounds due to the application of a high temperature for a long period of time (SONAGLIO et al., 2007).

The utilization of membrane technologies for concentrating bioactive compounds from natural products has been successfully employed, for example, with *Ginkgo biloba* extract (XU; WANG, 2005). Compared to the traditional methods used for concentrating biologically active compounds, membrane concentration process reveals new possibilities because of its advantages, such as working at ordinary temperatures, absence of phase transition, and low energy consumption (SANTAMARÍA et al., 2002). This procedure is based on the principle of selective permeation of the solute molecules through semi-permeable membranes. The liquid that is retained by the membrane is called concentrate and the liquid that passes through it is called permeate. In most membrane processes, such as microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration, and reverse osmosis, the driving force for mass transfer across the membrane is mechanical pressure (MAROULIS;

SARAVACOS, 2003). The main advantage of employing NF membranes for the concentration of bioactive compounds of mate is that by selecting membranes with suitable molecular weight cut-off (MWCO), this technology can be used to fractionate molecules of similar molecular weight (100–1000 Da range).

The aim of this work was to characterize the bioactive compounds in extract and concentrated extract of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Besides evaluating the effects of NF on these valuable bioactive compounds, in this work we also evaluated the antioxidant activity of these mate extracts *in vitro* and using eukaryotic cells of *Saccharomyces cerevisiae* (yeast assay).

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 CHEMICALS

The hydrochloric acid, sodium hydroxide, sodium carbonate, ethanol, methanol, dichloromethane, chloroform, acetonitrile, glacial acetic acid, sodium chloride, formic acid and n-butanol were obtained from Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil). The Folin Ciocalteu phenol reagent, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), vanillin, tannic acid, chlorogenic acid, gallic acid, perchloric acid, caffeine, theobromine, ursolic acid and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All reagents were either of analytical or of chromatographic grade.

2.2 PLANT MATERIAL

The leaves of *Ilex paraguariensis* St. Hil. used for the preparation of the extract were harvested in Catanduvas, Santa Catarina state, Brazil. After the leaves were picked, they were washed and the excess water on the surface of the leaves was removed by centrifugation. After that, the leaves were dried in a forced air oven (FABBE, 171, São Paulo, Brazil) for 24 h at 45 °C and then they were ground with a knife mill (Marconi, MA-580, Piracicaba, Brazil) until reaching a particle size smaller than 3.55 mm. The ground leaves were placed in plastic bags and kept at - 18 °C until the preparation of the aqueous extracts.

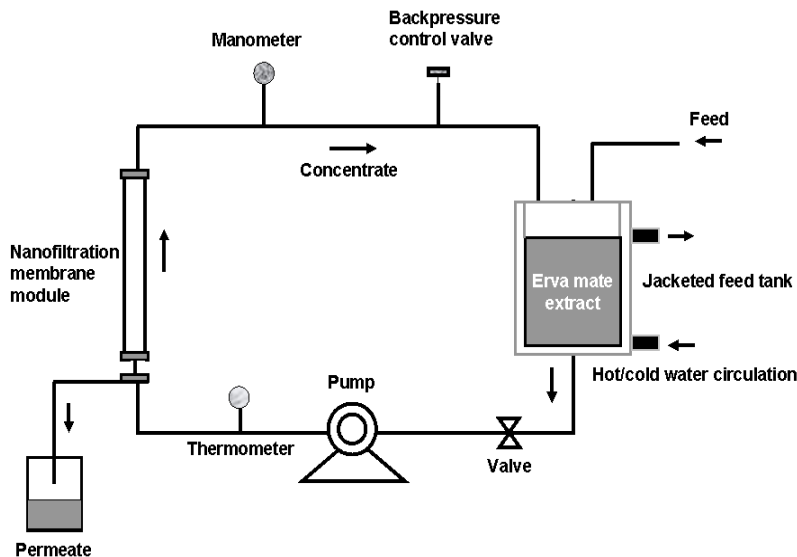
2.3 PREPARATION OF THE MATE EXTRACT

The mate extract was produced according to Murakami et al. (2011), using 3 g of ground leaves suspended in 100 mL of distilled water with constant stirring. The pH was adjusted to 6.0 by adding either 0.1 N hydrochloric acid or 0.1 N sodium hydroxide solutions and using a pHmeter (Quimis, Q-400A, Diadema, SP, Brazil). The extracts were filtered with filter paper (12.5 cm diameter and 25 μ m pore size) using a vacuum pump (Primatec, 131, Itu, Brazil) and the extract volumes were completed up to 100 mL with distilled water (referred to as 3 g/100 mL extracts).

2.4 CONCENTRATION OF THE MATE EXTRACT

Nanofiltration (NF) was applied to concentrate biologically valuable components of mate extract. The concentration was performed with a tangential filtration system on a pilot scale equipped with a spiral membrane module (Osmonics membranes, HL2521TF, Minnetonka, USA), with a MWCO ranging between 150 and 300 Da, 0.6 m² of filtration area and 98 % rejection of MgSO₄ in a test performed by manufacturing with a spiral module at 25 °C and 690 kPa. The experiment was performed on a pilot equipment (Fig. 2.1) that allows the batch circulation mode, meaning that both the permeate and the concentrate could be carried back to the feed tank. The permeate was totally removed in order to obtain the concentrated mate extract.

Figure 2.1 - Schematic diagram of the nanofiltration unit.



The operating parameters controlled during the NF process were temperature of 24 ± 1 °C and pressure of 300 kPa, up to a VRF (Volumetric Reduction Factor) of 4. As was expected, a decrease in permeate flux was observed throughout the time, due to concentration polarization and fouling of membrane. It was obtained a permeate flux between $24.00 \text{ L}/(\text{h}\cdot\text{m}^2)$ and $0.50 \text{ L}/(\text{h}\cdot\text{m}^2)$, while the average permeate flux was equal to $4.53 \text{ L}/(\text{h}\cdot\text{m}^2)$. After each processing, the pilot unit and membrane were cleaned and hygienized, according to the manufacturer's instructions.

2.5 ANALYTICAL METHODS

The characterization of the mate extract and concentrated mate extract were used to evaluate the effects of membrane separation on the profile of the biologically active compounds present in the leaves of *Ilex paraguariensis*.

2.5.1 Total phenolic content and chlorogenic acid

The total polyphenol content (TPC) of the extracts were determined following a Folin–Ciocalteu procedure (SINGLETON;

JOSEPH; ROSSI, 1965). The appropriate dilutions of extracts were oxidized with Folin–Ciocalteu reagent and its reaction was neutralized with sodium carbonate. The absorbance of the resulting blue color was measured at 765 nm, after 60 min, with a UV-Vis Spectrophotometer (Model U-1800; Hitachi, Tokyo, Japan). The TPC was expressed as gallic acid equivalents in milligrams per 1 mL of extract (mg GAE/mL).

The determination of chlorogenic acid was performed using an HPLC system (Shimadzu LC-10, Kyoto, Japan) equipped with a reverse-phase column (Shim-pack C18, 4.6 mm Ø x 250 mm), thermostated at 40 °C, and a UV-visible detector (Shimadzu SPD 10A, λ = 280 nm). An isocratic mobile phase of water: acetic acid: n-butanol (350:1:10, mL/mL/mL) mixture was used with a flow rate of 0.8 mL/min. The injection volume was 10 μ L. For the quantitative analysis, a standard calibration curve was obtained by plotting the peak area against different concentrations of chlorogenic acid. The curve showed a good linearity and followed Beer's Law (r^2 = 0.99). Similarly, the final concentration of chlorogenic acid present in the samples was determined as average content after three consecutive injections.

2.5.2 Methylxanthine compounds

A volume of 15 mL of each extract was treated with 60 mL of dichloromethane for 1h and the organic phase was concentrated to 2 mL under low pressure. The HPLC analysis was performed on a Shimadzu LC-10A system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a UV-visible detector SPD 10A set at 272 nm. The experiments were carried out on a reversed-phase Shim-pack C₁₈ (4.6 mm Ø x 250 mm) column. The system was operated isocratically at 30 °C using a mobile phase composed of acetonitrile:0.1 % formic acid (15: 85 v/v), with a flow-rate of 1.0 mL/min. Prior to injection, all the samples were centrifuged (2,800 \times g/10 min) (Hermle, Z 200A, Wehingen, Germany) and filtrated through 0.22 μ m micropore membranes.

The injection volume was 10 μ L for the mate extract and 5 μ L for the concentrated mate extract. For quantitative analysis, standard calibration curves were obtained for caffeine (1.0 to 100.0 μ g/mL; r^2 = 0.99) and for theobromine (2.5 to 50 μ g/mL; r^2 = 0.99). The final concentrations of each sample were determined by three consecutive injections (STRASSMANN et al., 2008).

2.5.3 Total saponins content

The extraction procedure was performed according to Gnoatto, Shenkel, and Bassani (2005). The saponins present in 10 mL of each of the two extracts were hydrolyzed with 5 mL of HCl 12 mol/L for 2 h under reflux. The saponins were extracted with 6 mL of chloroform. The organic phase was evaporated in a rotatory evaporator and the residue was resuspended into 10 mL of ethanol.

Determination of the total triterpene saponins content was conducted using a colorimetric method presented by Xiang et al. (2001) with slight modifications. The principle of this method is the reaction of oxidized triterpene saponins with vanillin. Perchloric acid is the strong oxidant and the distinctive color of this reaction is purple. Aliquots from the ethanolic phase were totally evaporated and then 150 μ L of 5 % (w/v) vanillin - glacial acetic acid solution and 500 μ L of perchloric acid were added to the dry residue obtained. The mixture was incubated at 60 °C for 45 min, cooled down in ice bath and then added with glacial acetic acid. The absorbance rate was measured with a UV/Vis spectrophotometer (Hitachi, U-1800, Japan) at 548 nm. The total saponins content was quantified by using a standard calibration curve of ursolic acid ($y = 0.00087205 - 0.02339x$, $r^2 = 0.99$), the major triterpenic nucleus of *Ilex paraguariensis*.

2.5.4 Condensed tannins content

The methodology to determine the condensed tannins content is described in this present work consists of two stages: stage A, where the total polyphenols are quantified; and stage B, where residual polyphenols are quantified after adsorption of tannins by gelatin (VALDES; LEYES; LÉON, 2000). In stage A, 4.5 mL of extract was treated by adding 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent, 0.5 mL of sodium carbonate (20 %), then it was stirred and the volume was completed with distilled water to 125 mL. The absorbance was measured with a UV/Vis spectrophotometer (Hitachi, U-1800, Japan) at 700 nm, after 2 minutes. In stage B, 10 mL of extract was diluted in 40 mL of distilled water and added with 25 mL of gelatin (25 %). After that, 50 mL of saturated solution of 1 % sodium chloride acidified and 5 g of kaolin were added to the solution. The solution was then capped and stirred for 30 minutes ($700 \times g$) and immediately afterwards it was filtered. From this solution, the procedure of stage A was repeated. The condensed

tannins were quantified by using a standard calibration curve of tannic acid (1.0 to 10.0 mg/mL; $r^2 = 0.97$; $y = 0.0869x + 0.0785$).

2.5.5 Chlorophyll content

One milliliter of each extract was added in 7 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) and the mixture was then placed in an oven at 65 °C for 15 - 20 minutes. After that, 3 mL of the obtained solution (chlorophyll) was analyzed with a UV/Vis spectrophotometer (Hitachi UV/Vis, U-1800) set at 645 and 663 nm. The DMSO reagent was used as a blank solution. The results showed the content of total chlorophyll (HISCOX; ISRAELSTAM, 1978).

2.5.6 Antioxidant activity in vitro

The *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* radical (DPPH) assay was based on the method proposed by Brand-Williams, Cuvelier and Berset (1995) method. An aliquot of 0.1 mL of each extract was mixed with 3.9 mL DPPH methanol of 60 μ M solution. The mixture was vigorously shaken and then the absorbance rate was measured at 515 nm every 10 minutes until it stabilized (Hitachi UV/Vis, U-1800). Methanol was used as blank solution instead of DPPH solution. EC50 value (μ g extract/mL) is the effective concentration at which DPPH radicals were scavenged by 50 % and it was obtained by interpolation from linear regression analysis.

2.5.7 Antioxidant activity (yeast assay)

The evaluation of antioxidant activity was carried out using eukaryotic cells of *Saccharomyces cerevisiae* strain XV185-14c (MAT α , ade2-2, arg4-17, his1-7, lys1-1, trp5-48, hom3-10). Yeast cell suspensions containing 2×10^7 cells/mL (exponential phase) were treated with 75 mM hydrogen peroxide, in the presence of concentrated and mate extracts. This dilution was the highest non-cytotoxic concentration of both extracts determined in preliminary assays. The tubes were incubated for 1 h at 28 °C. The samples were then serially diluted in saline solution 0.9 % (w/v), plated onto YPD (10 g/l of yeast extract, 20 g/L of peptone, 20 g/L of dextrose and 20 g/L of agar-agar) and incubated at 28 °C for 48 h. After incubation, the colonies were counted, and 100 % survival was considered the total of colonies observed on the

control plate (untreated cells) (WILMSEN; SPADA; SALVADOR, 2005).

2.6 STATISTICAL ANALYSIS

All the data were evaluated using the software STATISTICA version 6.0 (2001) (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) and expressed as mean \pm standard deviation (SD) of triplicate measurements. Tukey's studentized range test was carried out to test for any significant differences between the mate extract and concentrated mate extract. A difference was considered statistically significant when $p < 0.05$.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The chemical compositions of the mate extract and the concentrated mate extract are shown in Table 2.1. Significant changes occur in the concentration of bioactive compounds of mate extract after nanofiltration (NF). Concentration by NF does not occur only because of the MWCO of the membrane; it can also have occurred because of the common structural properties of hydrophobic compounds, which generally include aromatic (benzene) ring structures that have aliphatic carbon groups which, if undissociated in pH conditions lower than their pK_a values, can be readily adsorbed in this kind of hydrophobic membrane (YOON et al., 2006).

Table 2.1 - Chemical compositions of the mate extract and of the concentrated mate extract.

	Concentrated mate extract	Mate extract
Total phenolic content (mg GAE/mL)	7.821 \pm 0.039 ^a	2.316 \pm 0.003 ^b
Chlorogenic acid (μ g/mL)	9003.92 \pm 165.34 ^a	1862.42 \pm 3.49 ^b
Methylxanthines (μ g/mL)		
Caffeine	3142.18 \pm 366.64 ^a	1253.40 \pm 72.53 ^b
Theobromine	171.30 \pm 10.51 ^a	53.08 \pm 1.44 ^b
Total saponins content (μ g/mL)	365.95 \pm 14.01 ^a	173.43 \pm 5.14 ^b
Condensed tannins content (g TA/100 g d.e.)	35.58 \pm 0.42 ^a	12.81 \pm 0.74 ^b
Total chlorophyll content (μ g/mL)	36.03 \pm 3.42 ^a	11.23 \pm 0.31 ^b

Data are mean \pm SD (n = 3); TA: Tannic acid; d.e.: dry extract Mean values in the same line followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

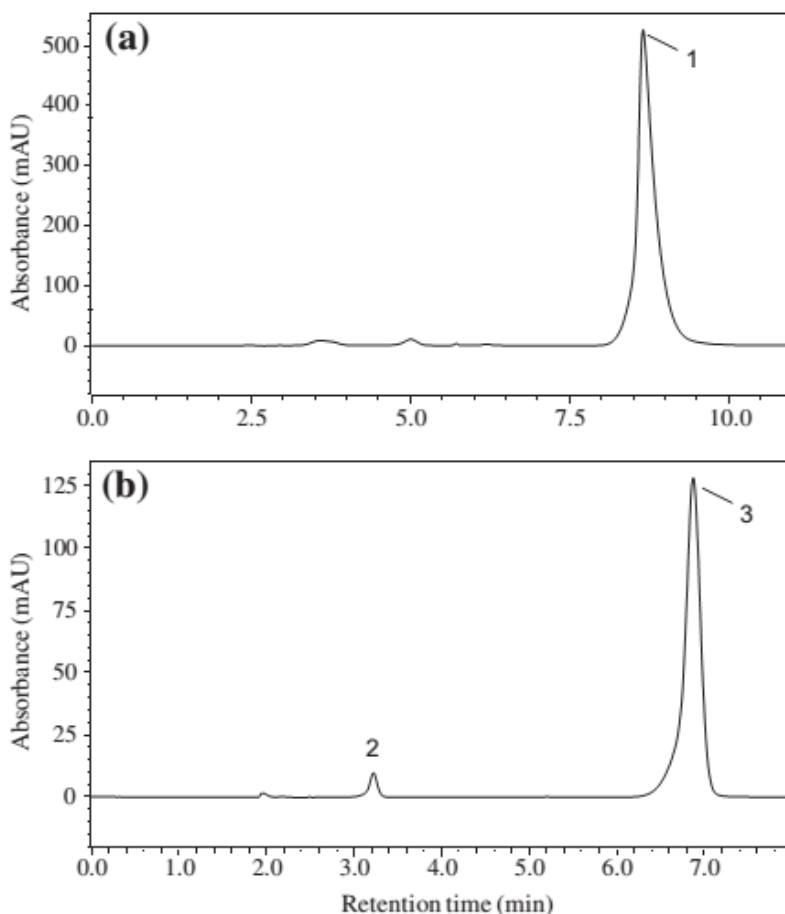
As noted by Murakami et al. (2011) and by Prudêncio et al. (2012) with mate leaf extract and mate bark extract, in this present study it was possible to concentrate bioactive compounds from mate extract by NF (Table 2.1). The content of chlorogenic acid was determined because it is present in higher concentrations in mate (PAGLIOSA et al., 2010). Fig. 2.2 (a) shows a representative HPLC-DAD chromatogram of chlorogenic acid identified and quantified in the mate samples. The same behavior obtained by Murakami et al. (2011) was verified in this present study, i.e., the concentration of chlorogenic acid increased after nanofiltration.

The methylxanthine content in the concentrated mate extract was higher ($p < 0.05$) than in the mate extract. Fig. 2.2 (b) shows a representative HPLC-DAD chromatogram of the methylxanthines identified and quantified in the mate samples. After nanofiltration, the concentration of theobromine (322.72 %) increased more than the concentration of caffeine (250.70 %). As expected, the theobromine content was much lower than the caffeine contents in both extracts. The large amount of caffeine in the leaves of *Ilex paraguariensis* not only is responsible for the stimulant effect of mate, but it is also responsible for several other biological activities. Silva et al. (2011) suggested that mate consumption could decrease body weight and adiposity, most probably because of caffeine's ability to increase thermogenesis. Moreover, Strassmann et al. (2008) noted that treatments performed with mate extract and with caffeine on the vascular membranes of chick embryos yolk sac showed pro-vasculo- and angiogenic properties and also embryonic growth enhancement. However, based on available evidence, it is suggested that caffeine intake should be less than 300 mg caffeine per day (equivalent to 4.6 mg/ (kg·day) in a 65 kg person) while children should consume less than 2.5 mg/ (kg·day) (NAWROT et al., 2003).

The leaves of *Ilex paraguariensis* contain a significant amount of triterpenoid saponins. These compounds are highly water-soluble and are responsible for the typically bitter taste of mate. Saponins may be used as a chemical fingerprint for authentication of mate. Adulteration by variable quantities of leaves of other *Ilex* species is rather common (HECK; MEJIA, 2007). Concentration of mate extract by NF increased the total saponin content by 211.01 %. According to the data in Table 1, the total saponin content of the concentrated mate extract was 365.95 ± 14.01 µg/mL. Similar results were reported by Silva et al. (2011) for aqueous extract of unprocessed mate, 386.81 ± 1.58 µg/mL; however, the concentration of the extract used in that study was 7 g of ground leaves in 100 mL of water. Such high saponin content in concentrated

mate extract not only affects the flavor of the extract, but also provides hypocholesterolemic properties (MORAIS et al., 2009). The potential cholesterol-lowering properties were reported in a work of Morais et al. (2009), where a consumption of approximately 130 and 350 mg of saponins in yerba mate infusion provided further decrease in LDL-cholesterol in subjects undergoing statin therapy. Puangraphant, Berhow, and Mejia (2011) also credited the saponins of mate prevent inflammation and colon cancer *in vitro*.

Figure 2.2 - Representative HPLC-DAD chromatogram of mate extract: (a) phenolic compounds with signal at 280 nm; and (b) methylxantines with signal at 272 nm; (1) Chlorogenic acid; (2) Theobromine; (3) Caffeine.



The concentrated mate extract showed an amount of condensed tannins approximately 277.75 % higher than the mate extract. Studies on condensed tannins take on greater importance when considering the impact of these compounds on nutrition. Despite the known antinutritional activity of condensed tannins, Okuda (2005) reported several health-promoting effects of these compounds, such as inhibition of lipid peroxidation, carcinogen mutagenicity, and tumors and at the same time they promote antiviral activity, and potentiation of antibacterial activity.

In addition, according to the results shown in Table 1, the concentration of total chlorophyll content in the concentrated mate extract obtained by NF was 320.84 % higher compared to that of the mate extract. Ferruzzi and Blakeslee (2007) reported that chlorophylls have properties that are proven to benefit the human body, such as antioxidant activity, antimutagenic activity, modulation of xenobiotic metabolizing enzymes, and induction of apoptotic events in cancer cell lines. Moreover, chlorophyll gives an indirect estimation of the nutrient status because much of the leaf nitrogen is incorporated in chlorophyll.

Antioxidants are substances that counteract free radicals and prevent the damage they cause. These substances can greatly reduce the damage caused by oxidants by breaking them down before they react with biologic targets, preventing either chain reactions or activation of oxygen to highly reactive products (RATNAM et al., 2006). The results in Table 2.2 show that the concentrated mate extract had better ($p < 0.05$) antioxidant activity *in vitro* in comparison to the mate extract. Prudêncio et al. (2012) and Boaventura et al. (2013) also noted substantial differences between DPPH EC50 in the mate aqueous extracts of bark and leaves after concentration processes. The well-known antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* is related to the presence of several compounds, mainly chlorogenic acid (ANESINI et al., 2012). However, tests that measure antioxidant activity *in vitro* do not always show this behaviour *in vivo*. Wilmsen, Spada, and Salvador (2005) reported that the evaluation of antioxidant activity using *Saccharomyces cerevisiae* yeast as a biological system model is a quick test that shows representative results for studies of oxidative stress in eukaryotic cells treated with hydrogen peroxide.

Table 2.2 - DPPH mean values for the concentrated and mate extracts analyzed and mean survival values of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast treated with hydrogen peroxide (H₂O₂) 75 mM in presence and absence of concentrated and mate extracts.

	DPPH EC50 value ($\mu\text{g/mL}$) \pm SD
Mate extract	129.79 \pm 4.12 ^a
Concentrated extract	4.19 \pm 1.23 ^b
	Survival (%) \pm SD
Water	100.00 \pm 0.00 ^a
H ₂ O ₂ 75 mM	45.00 \pm 0.00 ^d
Mate extract 0.01 % + H ₂ O ₂ 75 mM	86.65 \pm 5.65 ^b
Concentrated extract 0.01 % + H ₂ O ₂ 75 mM	67.53 \pm 3.53 ^c

Data are mean \pm SD (standard deviation) (n = 3).

Mean values in the same line followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

EC50: (% of amount of samples necessary to scavenge 50% of DPPH).

Both the samples that were evaluated were able to protect the yeast cells against damage caused by hydrogen peroxide (Table 2.2). Additionally, the results obtained in this present study indicate that the phenolic compounds present in the samples play an important role in antioxidant activity. Differences ($p < 0.05$) in the survival rates of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast treated with hydrogen peroxide of mate and concentrated mate extracts were noted in this present study. However, antioxidant activity does not seem to depend exclusively on total polyphenol content. As observed by Stefenon et al. (2010) in red sparkling wines, samples with significant amounts of phenolic compounds did not show the highest antioxidant activity. Medina et al. (2011) also noted there was no correlation with the antioxidant activity measured by DPPH in araçá extract. It is possible that the lower protection of yeast cells against damage caused by hydrogen peroxide is due to condensation reactions influenced by nanofiltration. Halliwell (2008) reported that, under certain experimental conditions and in high concentrations, some polyphenols such as phenolic acids can exert pro-oxidant activities, forming compounds that have toxic effects and may cause cell death. The high concentrations of phenolic compounds in the concentrated mate extract obtained by NF probably explain their lower protective effect over yeast cells. Additional studies are under way to identify other compounds that are possibly present in these extracts and

that may be further developed for nutraceutical and therapeutic applications.

4 CONCLUSIONS

It can be stated that the use of nanofiltration is a valid approach for the concentration of biologically active compounds in aqueous extract of mate. The results showed that there was a significant increase in the contents of total phenolic, chlorogenic acid, methylxanthines, chlorophyll, and saponins, all of which are compounds that may have an important role in maintaining good health. Moreover, the mate extract and the concentrated mate extract showed differences in the survival rates of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast treated with hydrogen peroxide.

REFERENCES

- ANESINI, C.; TURNER, S.; COGOI, L.; FILIP, R. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, p. 299-304, 2012
- BOAVENTURA, B. C. B.; MURAKAMI, A. N. N.; PRUDÊNCIO, E. S.; MARASCHIN, M.; MURAKAMI, F. S.; AMANTE, E. R., AMBONI, R. D. D. M. C. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, v. 53, p. 686-692, 2013.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- FERRUZZI, M. G.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption and cancer preventive activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research**, p. 27, p. 1-12, 2007.
- GNOATTO, S.C.B.; SHENKEL, E.P.; BASSANI, V.L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 723-726, 2005.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, p. 107–112, 2008.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 138–151, 2007.

HISCOX, J. D.; IARAELESTAM, G. F. A method for extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botanicals**, v. 57, p. 1332–1334, 1978.

MAROULIS, Z. B.; SARAVACOS, G. D. **Food Process Design**. Marcel Dekker Inc., New York, Cap. 10, 2003.

MEDINA, A. L.; HAAS, L. I. R.; CHAVES, F. C.; SALVADOR, M.; ZAMBIAZI, R. C.; DA SILVA, W. P.; NORA, L.; ROMBALDI, C. V. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, p. 916–922, 2011.

MORAIS, E.C.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G. A.; BOAVENTURA, B.C.B.; ANDRADE, F.; WASLAWIK, E.; DI PIETRO, P.F.; MARASCHIN, M.; SILVA E.L. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8316–24, 2009.

MURAKAMI, A.N.N.; AMBONI, R.D.M.C.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMANTE, E.R.; ZANOTTA, L.M.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J.C.C.; TEÓFILO, R.F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 2211–2216, 2011.

NAWROT, P.; JORDAN, S.; EASTWOOD, J.; ROTSTEIN, J.; HUGENHOLTZ, A.; FEELEY, M. Effects of caffeine on human health. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, p. 1–30, 2003.

OKUDA T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2012–2031, 2005.

PAGLIOSA, C. M.; SIMAS, K. N.; AMBONI, R. D. M. C.; MURAKAMI, A. N. N.; PETKOWICZ, C. L. O.; MEDEIROS, J. D.; RODRIGUES, A. C.; AMANTE, E. R. Characterization of the bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 428–433, 2010.

PUANGPRAPHANT,S.; BERHOW, M. A.; MEJIA, E. G. Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) saponins induce caspase-3-dependent apoptosis in human colon cancer cells in vitro. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1171–1178, 2011.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v.113, p.189–207, 2006.

SANTAMARÍA, B.; SALAZAR, G.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J.L. Membrane sequences for fractionation of polyphenolic extracts from defatted milled grape seeds. **Desalination**, v.148, p. 103–109, 2002.

SILVA, R. D.; BUENO, A.L.S.; GALLON, C.W.; GOMES, L.F.; KAISER, S.; PAVEL, C.; ORTEGA, G.G.; KUCHARSKI, L.C.; JAHN. M.P. The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male wistar rats. **Fitoterapia**, v. 82, p. 818–826, 2011.

SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p.144-149, 1965.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre, Brazil: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2007. p. 289 – 326.

STEFENON, C. A.; COLOMBO, M.; BONESI, C. D. M.; MARZAROTTO, V.; VANDERLINDE, R.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Antioxidant activity of sparkling wines produced by champenoise and charmat methods. **Food Chemistry**, v.119, p. 12-18, 2010.

STRASSMANN, B.B.; VIEIRA, A.R.; PEDROTTI, E.L.; MORAIS, H.N.F.; DIAS P.F.; MARASCHIN, M. Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8348–8353, 2008.

VALDES, H.L.; LEYES, E. R.; LÉON, H.P. Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. **Revista Cubana Plantas Medicinales**, v. 5, p. 17-22, 2000.

WILMSEN, P. K.; SPADA, D. S.; SALVADOR, M. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 4757-4761, 2005.

XIANG, Z. B.; TANG, C. H.; CHEN, G.; SHI, Y. S. Studies on colorimetric determination of oleanolic acid in Chinese quince. **Natural Product Research and Development**, v. 13, p. 23–26, 2001.

XU, L.; WANG, S. The *Ginkgo biloba* extract concentrated by nanofiltration. **Desalination**, v. 184, p. 305-313, 2005.

YOON, Y.; WESTERHOFF, P.; SNYDER, S.A.; WERT, E.C. Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products. **Journal of Membrane Science**, v. 270, p. 88–100, 2006.

CAPÍTULO 3 - INFLUÊNCIA DE MALTODEXTRINAS COM DIFERENTES DE NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTABILIDADE DO EXTRATO CONCENTRADO DE ERVA-MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS* A. ST. HIL) UTILIZANDO O PROCESSO DE *SPRAY DRYING*

Artigo enviado para publicação para a revista *LWT-Food Science and Technology* (ISSN: 0023-6438).

Influência de maltodextrinas com diferentes DE nas propriedades físico-químicas, atividade antioxidante e estabilidade do extrato concentrado de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) utilizando o processo de *spray drying*

RESUMO

O extrato concentrado de erva-mate (CM) obtido por nanofiltração, uma fonte rica em compostos fenólicos, foi microencapsulado utilizando maltodextrinas com três diferentes valores de DE: 10,2 (M10), 15,2 (M15) e 18,6 (M20), em *spray drying*. O CM sem a adição de maltodextrina também foi submetido ao processo de *spray drying* e identificado como controle. Todas as microcápsulas foram caracterizadas em relação ao rendimento, compostos fenólicos, teor de umidade, atividade de água, dissolução, higroscopicidade, cor, morfologia e tamanho de partícula e propriedades térmicas. A avaliação da estabilidade das microcápsulas foi realizada em três temperaturas de estocagem diferentes, 5, 25 e 45 °C, durante 90 dias. A microcápsula M10 teve o maior rendimento e mostrou melhores resultados de dissolução, higroscopicidade, teor de umidade e propriedades térmicas em relação a M15 e M20. Além disso, ao comparar o efeito dos agentes encapsulantes, a maltodextrina com DE 10,2 originou microcápsulas (M10) mais estáveis do que as outras maltodextrinas, sendo considerado o material de parede mais eficaz na estabilização dos compostos fenólicos do extrato concentrado de erva-mate.

Palavras-chave: Erva-mate, microencapsulação, nanofiltração, compostos fenólicos, atividade antioxidante.

Influence of DE-value of maltodextrin on physicochemical, antioxidant properties, and storage stability of concentrated mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) spray dried

ABSTRACT

Concentrated mate (CM) obtained by nanofiltration which is a rich source of phenolic compounds was used for encapsulation using three different DE (dextrose equivalent)-values of maltodextrin: DE10.2 (M10), DE15.2 (M15) and DE18.6 (M20) by spray drying process. The CM without addition of maltodextrin was also spray dried and denominated as control. All microcapsules powder were characterized in relation to yield, phenolic compounds, moisture content, water activity, dissolution, hygroscopicity, color, SEM particle microstructure, and thermal properties analyses. The storage stability of microcapsules was investigated in three storage temperatures (5 °C, 25 °C and 45 °C) until 90 days. The M10 has the highest drying yield and showed better results of dissolution, hygroscopicity, moisture content and thermal properties than M15 and M20. Moreover, compared to maltodextrins DE15.2 (M15) and DE18.6 (M20), maltodextrin DE10.2 (M10) created more stable microcapsules than other two maltodextrins, and was found the most effective wall material in stabilizing the phenolic compounds of CM.

Keywords: Yerba mate, microencapsulation, nanofiltration, phenolic compounds, antioxidant activity.

1 INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis* St. Hilaire (erva-mate) é uma importante planta nativa da Argentina, Paraguai, Uruguai e da região sul do Brasil, tendo uma grande representatividade econômica nesses países (BRACECO et al., 2011). O consumo de erva-mate tem aumentado devido aos seus reconhecidos benefícios à saúde, os quais são atribuídos à presença dos metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, metilxantinas e saponinas, os quais são extraídos das folhas durante o preparo das infusões (HECK; MEJIA, 2007). Os compostos fenólicos estão sendo muito estudados por suas diversas funções biológicas. Pesquisas científicas têm mostrado que a erva-mate possui propriedades farmacológicas importantes, sendo algumas delas o efeito cardioprotetor (BALZAN et al., 2013), efeito inibidor da proliferação de células cancerígenas (MEJIA et al., 2010), efeito anti-obesidade (PIMENTEL et al., 2013) e efeito antioxidante (BLUM-SILVA et al., 2015).

A concentração por nanofiltração foi empregada com sucesso em compostos bioativos da erva-mate (MURAKAMI et al., 2011; PRUDÊNCIO et al., 2012). Ao contrário dos métodos tradicionais de concentração, a utilização de processos de separação por membranas apresenta uma série de vantagens, tais como a não utilização de solventes orgânicos ou outras substâncias químicas para o processo de concentração, alta eficiência de recuperação, baixas temperaturas de operação e baixo consumo de energia (CONIDI; CASSANO; DRIOLI, 2012; MATTA; MORETTI; CABRAL, 2004).

No processamento e armazenamento de alimentos, os compostos fenólicos são instáveis sob diversas condições como na presença de enzimas oxidativas, em altas temperaturas, pH, umidade e na presença de luz e oxigênio (FANG; BHANDARI, 2010). Neste contexto, processos de microencapsulação, tais como *spray drying*, são alternativas para aumentar a estabilidade de compostos sensíveis, protegendo-os de condições ambientais adversas. O *spray drying* transforma suspensões em micropartículas em pó, constituídas por um material de parede e um núcleo. A maltodextrina, obtida a partir da hidrólise ácida ou enzimática de diferentes fontes de amido (milho, batata ou outros), é o biopolímero mais comum usado como agente encapsulante em *spray drying*, devido ao seu baixo custo e eficácia (DESAI; PARK, 2005; JAFARI et al., 2008; NUNES et al., 2015). Alguns estudos têm explorado o uso de maltodextrina com diferentes valores de dextrose equivalente (DE) entre 10 e 20 para proteção de compostos sensíveis, como os compostos fenólicos (ÇAM; IÇYER;

ERDOGAN, 2014; PANG; YUSOFF; GIMBUN, 2014; NUNES et al., 2015).

Neste estudo, o extrato concentrado de mate foi microencapsulado utilizando maltodextrinas com diferentes valores de DE em *spray drying*. As microcápsulas foram avaliadas em relação às suas características físico-químicas e morfológicas. A estabilidade das microcápsulas foi avaliada a 5 ± 1 , 25 ± 1 e 45 ± 1 °C, por 90 dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES

Os reagentes Folin-Ciocalteu, radical 2,2-difenil-1- picrilhidrazila (DPPH), 2,4,6-tripiridil-*s*-triazina (TPTZ), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (Trolox), ácido clorogênico, foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St., Louis MO, USA). A Maltodextrina MOR REX[®] 1910 (M10) (DE10,2), maltodextrina MOR REX[®] 1915 (M15) (DE15,2) e maltodextrina MOR REX[®] 1920 (M20) (DE18,6) foram obtidas da Corn Products (São Paulo, SP, Brasil). Todos os reagentes são de grau analítico ou cromatográfico.

2.2 PREPARO DAS FOLHAS

As folhas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. foram colhidas na cidade de Catanduvas, Santa Catarina, Brasil. As folhas foram higienizadas, realizado o branqueamento e secas em estufa com circulação de ar (FABBE, 171) a 45 °C por 24 horas, e posteriormente moídas em moinho de facas (Marconi, MA-580). As amostras secas foram embaladas a vácuo (embaladora Selovac, modelo 200 B) em sacos de polietileno de alta densidade e mantidas em freezer a -18 ± 1 °C até o momento das análises.

2.3 PREPARO DO EXTRATO

O extrato aquoso das folhas de erva-mate foi preparado de acordo com Murakami et al. (2011), utilizando-se 30 g de folhas trituradas em 1 L de água destilada aquecida por 3 minutos a 90 ± 1 °C. O extrato foi filtrado utilizando filtro de papel (12,5 cm de diâmetro com porosidade de 25 µm), com auxílio de uma bomba a vácuo (Prismatec, 131). O volume do extrato foi ajustado para 1 L com água destilada.

2.4 CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE POR NANOFILTRAÇÃO

A concentração foi realizada em um sistema de filtração tangencial utilizando uma unidade piloto, equipada com uma membrana de nanofiltração de configuração espiral (Osmonics, HL2521TF), com ponto molar de corte de 150 a 300 g/mol, área filtrante de 0,6 m² e 98 % de rejeição de MgSO₄ observada em um teste realizado a temperatura de 25 °C e 690 kPa, como descrito por Murakami et al. (2013).

O equipamento permite a circulação de extrato, o que significa que ambos, o permeado e o concentrado, podem ser levados de volta ao tanque de alimentação. O permeado foi totalmente removido, a fim de obter o extrato concentrado do mate (CM).

Os parâmetros de operação controlados durante o processo de nanofiltração foram temperatura de 24 ± 1 °C e pressão de 3 bar, até um FRV (Fator de Redução Volumétrica) de 4. Um fluxo de permeado foi obtido entre 0,50 e 24,0 L/h.m², enquanto a média do fluxo do permeado foi de 4,53 L/h.m². Após cada etapa do processamento, foi realizada a limpeza da membrana e do equipamento, de acordo com as instruções do fabricante.

2.5 PREPARO DAS MICROCAPSULAS

Três soluções de alimentação foram preparadas, misturando-se o extrato de erva-mate concentrado (CM) com 30 % (m/v) de maltodextrina DE10,2, DE15,2 e DE18,6. As soluções foram denominadas M10, M15 e M20, respectivamente. O CM, sem a adição de maltodextrina, também foi submetido à secagem em *spray dryer* e denominado controle. Cada solução de alimentação foi homogeneizada em Ultraturrax IKA T25 a 14.000 x g por 5 minutos. Em seguida foram submetidas ao *spray dryer* de escala laboratorial (Buchi, B-290), operado com temperatura de entrada de ar de 150 ± 5 °C, temperatura de saída de ar de 52 ± 5 °C, fluxo de ar de 35 m³/h, taxa de alimentação de 6 mL/min e pressão de atomização de 0,7 MPa. O material foi armazenado em frasco âmbar até o momento das análises (NUNES et al., 2015).

2.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

2.6.1 Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante

Primeiramente foi realizada a remoção do material de revestimento das microcápsulas, para a liberação dos compostos fenólicos, de acordo com método proposto por Nunes et al. (2015). As microcápsulas foram pesadas de acordo com o teor de sólidos totais presentes na solução de alimentação antes de entrar no *spray dryer* e posteriormente foram dispersas em 1 mL de solução de etanol, ácido acético e água (50:8:42 v/v/v). Essa dispersão foi agitada, usando Vortex (VTX-F Biomixer) por 1 minuto e, em seguida, colocada em um ultrassom (MaxiClean 1650A) duas vezes por 20 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 12000 x g durante 5 minutos e, depois, filtrado (filtro Millipore com porosidade de 0,45 µm).

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) dos pós produzidos em *spray dryer* (controle, M10, M15 e M20) foram determinados de acordo com o método Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Joseph e Rossi (1965). Os resultados foram expressos em mg de ácido clorogênico equivalente (EAC) por mL.

Um dos métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante foi o DPPH, seguindo a metodologia proposta por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). As leituras de absorbância foram monitoradas a cada 10 minutos em comprimento de onda de 515 nm, em espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi, U-1800), onde foi observada a redução da absorbância até sua estabilização. Os resultados foram definidos como a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial de DPPH (concentração eficiente = EC50 mL da amostra/g de DPPH).

Outro método utilizado para avaliar a atividade antioxidante foi baseado no poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), conforme proposto por Benzie e Strain (1996). Nesse procedimento, os antioxidantes presentes nas amostras são avaliados como redutores de Fe^{3+} para Fe^{2+} , o qual é quelado pelo TPTZ para formar um complexo (Fe^{2+} -TPTZ) com máxima absorbância à 593 nm. Os resultados foram calculados utilizando Trolox como padrão e expressos como Trolox equivalente em µmol/mL.

2.6.2 Rendimento dos compostos fenólicos microencapsulados

Para a determinação dos compostos fenólicos na superfície, 200 mg das microcápsulas foram tratados com 2 mL de uma mistura de etanol e metanol (1:1). Estas dispersões foram agitadas em Vortex (VTX-F Biomixer) à temperatura ambiente durante 1 minuto e, em seguida, filtradas (filtro Millipore com porosidade de 0,45 µm). O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; JOSEPH; ROSSI, 1965). Os compostos fenólicos da superfície (CFS) e o rendimento dos compostos fenólicos microencapsulados (RCFM) foram calculados como descrito por Robert et al. (2010), com modificações, de acordo com as Equações (1) e (2), respectivamente.

$$\text{CFS (\%)} = \frac{\text{Compostos fenólicos da superfície}}{\text{Conteúdo teórico de compostos fenólicos}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{RCFM (\%)} = 100 - \text{CFS (\%)} \quad (2)$$

2.6.3 Teor de umidade, atividade de água e higroscopicidade

O teor de umidade foi determinado através da secagem em estufa a 105 °C, até peso constante, de acordo com a metodologia da AOAC (2005). A atividade de água foi medida, utilizando o equipamento Aqualab 4 TE (Decagon Devices, EUA), após prévia estabilização das amostras a 25 °C durante 15 minutos. Para determinar a higroscopicidade, 1 g de cada pó foi colocado em um recipiente hermético, contendo uma solução saturada de NaCl (umidade relativa de 75,3 %) a 25 °C. Após uma semana, as amostras foram pesadas e a higroscopicidade foi expressa em g de umidade absorvida por 100 g de massa seca da amostra (g/100 g).

2.6.4 Morfologia e tamanho de partícula

A morfologia e o tamanho de partícula das microcápsulas foram observadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol, modelo JSM 6390 LV (Jeol, Tóquio, Japão) a uma voltagem de 10 kV. Antes de serem colocadas em um suporte de alumínio, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro em um equipamento Leica,

modelo EM SCD 500 (Leica, Wetzlar, Alemanha), conforme descrito por Lian, Hsiao e Chou (2002). Pelo menos 120 partículas de cada uma das diferentes microcápsulas produzidas foram medidas para calcular o diâmetro médio (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2004).

2.6.5 Dissolução

O teste de dissolução foi realizado através da adição de 2 g de amostra em 25 mL de água destilada (EL-TINAY; ISMAIL, 1985). A mistura foi agitada em agitador magnético (Dist, modelo DI 03, Florianópolis, Brasil) a 892 rpm, com barra magnética de 2 mm x 7 mm. O tempo necessário para a completa dissolução do material foi avaliado.

2.6.6 Análise de cor

A análise da cor foi determinada através de colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-400, Osaka, Japão), ajustado para operar com iluminante D65 e ângulo de observação de 10°, previamente calibrado. A escala de cor CIELab foi usada para medir os parâmetros L^* , a^* e b^* . Nessa escala, o parâmetro L^* indica uma variação de cor do preto ao branco (0 a 100). O parâmetro a^* mostra a variação do vermelho ($+a^*$) ao verde ($-a^*$), enquanto o b^* pode variar do amarelo ($+b^*$) ao azul ($-b^*$).

2.6.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC das microcápsulas foram obtidas, utilizando-se um equipamento Shimadzu DSC-60 (Shimadzu, Kyoto, Japão), calibrado com padrão referência de índio puro (99,99 %). Amostras de aproximadamente 2 mg foram colocadas em placas de alumínio seladas, sob atmosfera de ar sintético (100 mL/ min) e aquecidas entre 30 °C e 400 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/ min.

2.6.8 Estudo da estabilidade ao armazenamento

As microcápsulas (M10, M15 e M20) e o controle foram avaliados em relação ao teor de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante (método de DPPH) durante a estocagem a 5 ± 1 °C, 25 ± 1 °C e 45 ± 1 °C. Os ensaios realizados estão descritos no item 2.6.1. As amostras foram colocadas em frascos âmbar e armazenadas na ausência de luz durante 90 dias (ERSUS; YURDAGEL, 2007)

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada, utilizando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as microcápsulas. As diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 ANÁLISE DOS PÓS

O maior rendimento ($p < 0,05$) dos pós obtidos a partir do *spray dryer* foi para a microcápsula M10 (Tabela 3.1). Os resultados revelaram que quanto maior o valor de DE da maltodextrina, menor o rendimento pelo processo de *spray dryer*. Resultados similares foram obtidos por Bakowska-Barcsak e Kolodziejczyk (2011), os quais mostraram que a maltodextrina com valor de DE 11 proporcionou melhor rendimento para os compostos fenólicos de groselha preta quando comparada as maltodextrinas de DE 18 e 21.

Tabela 3.1 - Efeito do DE da maltodextrina no rendimento dos compostos fenólicos microencapsulados (RCFM), no teor de compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante das microcápsulas e do controle.

Amostras	RCFM (%)	Compostos fenólicos totais (mg/g ácido clorogênico)	DPPH (EC50 (μg/g))	FRAP (μmol/g)
M10	98,02 ± 0,16 ^a	10,27 ± 0,19 ^b	16,52 ± 1,24 ^b	7,25 ± 0,52 ^b
M15	96,78 ± 0,11 ^b	10,28 ± 0,39 ^b	16,37 ± 0,10 ^b	7,79 ± 0,23 ^b
M20	96,39 ± 0,04 ^b	10,17 ± 0,14 ^b	16,48 ± 0,04 ^b	7,99 ± 0,42 ^b
Controle		21,13 ± 0,11 ^a	6,59 ± 0,43 ^a	19,98 ± 0,80 ^a

Os dados estão expressos como média ± DP (n = 3). Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras. RCFM: rendimento dos compostos fenólicos microencapsulados; Controle (extrato concentrado de mate por nanofiltração, CM, sem adição de maltodextrina); M10 (CM com maltodextrina de DE 10,2); M15 (CM com maltodextrina de DE 15,2) e M20 (CM com maltodextrina de DE 18,6).

Não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das amostras encapsuladas com maltodextrinas de diferentes valores de DE (M10, M15 e M20). Tonon, Freitas e Hubinger. (2010), Bakowska-

Barczak e Kolodziejczyk (2011) e Çam, İçyer e Erdogan (2014) obtiveram resultados similares ao microencapsularem groselha preta, suco de açaí e casca de romã, respectivamente, com maltodextrina.

A atividade de água das microcápsulas (Tabela 3.2) está dentro do intervalo normal encontrado para os produtos atomizados, e também dentro do limite recomendado para assegurar a estabilidade de pós ($< 0,3$). Como observado no estudo de Nadeem, Torun e Ozdemir (2011), não houve diferença significativa entre a atividade de água das microcápsulas preparadas com maltodextrinas de diferentes valores de DE. A adição de maltodextrina afetou a higroscopicidade das microcápsulas. As microcápsulas preparadas com maltodextrina DE10 apresentaram o menor valor de higroscopicidade. O mesmo comportamento foi observado por Tonon, Brabet e Hubinger (2009) para pó de suco de açaí. As diferenças de higroscopicidade podem ser explicadas pela estrutura química de cada agente encapsulante. O fenômeno de adsorção de água por um hidrato de carbono é atribuído às ligações entre os hidrogênios presentes nas moléculas de água e os grupos de hidroxilas disponíveis nas regiões amorfas do substrato, assim como nas regiões com superfícies cristalinas. A maltodextrina DE20 tem um grande número de ramificações com grupos hidrofílicos, adsorvendo facilmente a umidade do ar. No entanto, a maltodextrina DE10 é menos hidrolisada, apresentando um menor número de grupos hidrofílicos e, portanto, adsorvendo menos água.

Foi observado que quanto maior o valor de DE da maltodextrina, menor a solubilidade e maior teor de umidade dos pós (Tabela 3.2). Isso ocorre provavelmente devido a estrutura química da maltodextrina de maior valor de DE, que tem um grande número de ramificações com grupos hidrofílicos e, portanto, pode facilmente ligar-se a moléculas de água presentes no ar ambiente durante o manuseamento do pó logo após a secagem por *spray dryer*. Esses resultados estão de acordo com os dados obtidos por Fazaeli et al. (2012), que avaliaram o pó do suco de amora preta.

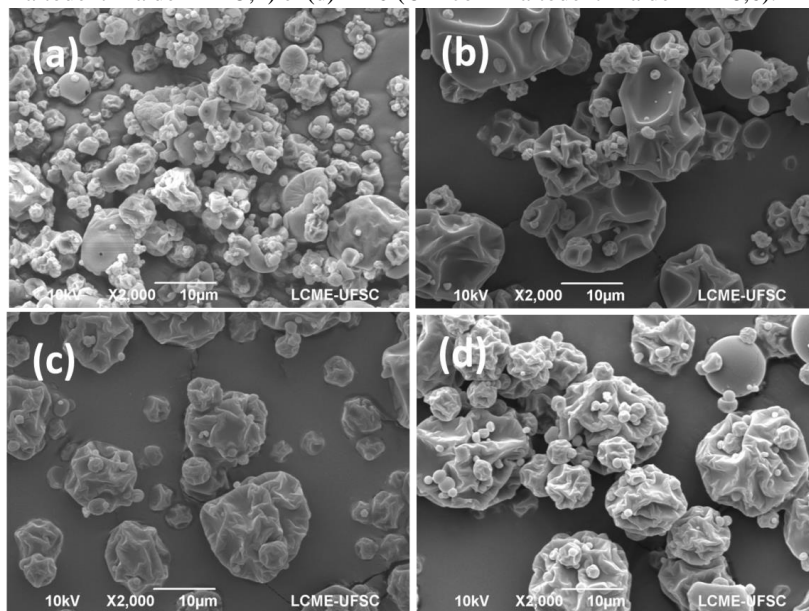
Tabela 3.2 - Propriedades físico-químicas do controle e das microcápsulas com diferentes valores de DE de maltodextrina.

Amostras	Atividade de água	Higroscopicidade (g/100g)	Dissolução em água (s)	Teor de umidade (g/100g)	Tamanho da partícula (µm)
M10	$0,148 \pm 0,005^b$	$17,05 \pm 0,44^a$	$385,05 \pm 14,91^a$	$3,09 \pm 0,08^a$	$11,69 \pm 1,80^a$
M15	$0,157 \pm 0,003^b$	$18,69 \pm 0,25^b$	$424,26 \pm 21,08^b$	$3,18 \pm 0,06^{ab}$	$10,78 \pm 1,22^a$
M20	$0,126 \pm 0,004^b$	$19,10 \pm 0,11^b$	$429,01 \pm 13,99^b$	$3,33 \pm 0,10^b$	$12,37 \pm 1,57^a$
Controle	$0,237 \pm 0,026^a$	$26,30 \pm 0,51^c$	$285,56 \pm 5,42^c$	$3,91 \pm 0,11^c$	$6,81 \pm 1,67^b$

Os dados estão expressos como média \pm DP (n = 3). Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras. Controle (extrato concentrado de mate por nanofiltração, CM, sem adição de maltodextrina); M10 (CM com maltodextrina de DE 10,2); M15 (CM com maltodextrina de DE 15,2) e M20 (CM com maltodextrina de DE 18,6).

As microcápsulas apresentaram tamanhos entre 10,78 e 12,37 μm (Tabela 3.2). Fang e Bhandari (2010) relataram que valores de tamanho de partículas que variam de 10 a 100 μm são esperados para microcápsulas obtidas a partir de *spray drying*. Na Figura 3.1 podem ser observadas as micrografias das amostras controle, M10, M15 e M20. Após o processo de secagem por *spray drying*, todas as amostras apresentaram uma superfície deformada e com presença de rugosidades. Rosenberg, Koperlman e Talmon (1985) sugeriram que a formação de superfícies dentadas das microcápsulas pode ser atribuída ao encolhimento das partículas durante o processo de secagem. De acordo com Ré (1998), imperfeições superficiais, tais como rugosidades ou fissuras, ocorrem quando há formação de película durante a secagem das gotículas por atomização. No entanto, Lian, Hsiao e Chou (2002) relataram que as fendas podem facilitar a fuga de calor do interior da partícula após a secagem. Morfologia similar foi observada em microcápsulas de extrato de *Orthosiphon stamineus* (Java) utilizando a maltodextrina como agente encapsulante (PANG; YUSOFF; GIMBUN, 2014).

Figura 3.1 – Micrografias dos pós secos em *spray drying*: (a) Controle (extrato concentrado de erva-mate por nanofiltração, CM, sem adição de maltodextrina); (b) M10 (CM com maltodextrina de DE 10,2); (c) M15 (CM com maltodextrina de DE 15,2) e (d) M20 (CM com maltodextrina de DE 18,6).



Os efeitos do tipo de material de revestimento sobre a cor dos pós estão apresentados na Tabela 3.3. Os resultados indicam claramente que não existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre as três microcápsulas em relação aos parâmetros L^* , a^* e b^* . As amostras M10, M15 e M20 apresentaram valores do parâmetro L^* maiores e valores de a^* e b^* menores do que os valores da amostra controle. Foi observado que a adição de maltodextrina tornou os pós mais claros ($p < 0,05$), porém com tendência a cor verde, conforme observado na diminuição do valor de a^* ($p < 0,05$). Os valores de b^* ($p < 0,05$) também diminuíram, porém mantendo valores positivos, indicando uma tendência a cor amarela.

Tabela 3.3 - Resultados da análise de cor das microcápsulas e do controle.

Amostras	L^*	a^*	b^*
M10	$86,57 \pm 0,10^a$	$-0,64 \pm 0,03^a$	$17,21 \pm 0,21^a$
M15	$86,24 \pm 0,12^a$	$-0,67 \pm 0,05^a$	$17,32 \pm 0,16^a$
M20	$85,93 \pm 0,02^a$	$-0,65 \pm 0,01^a$	$17,67 \pm 0,09^a$
Control	$69,67 \pm 0,35^b$	$1,57 \pm 0,32^b$	$27,51 \pm 0,87^b$

Os dados estão expressos como média \pm DP ($n = 3$). Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras. Controle (extrato concentrado de mate por nanofiltração, CM, sem adição de maltodextrina); M10 (CM com maltodextrina de DE 10,2); M15 (CM com maltodextrina de DE 15,2) e M20 (CM com maltodextrina de DE 18,6).

O comportamento térmico do controle e das microcápsulas (M10, M15, M20), podem ser observados nas curvas de DSC demonstradas na Figura 3.2. As curvas de DSC apresentam diferentes eventos endotérmicos bem definidos para o controle e para as microcápsulas, no qual correspondem à transição de fase relacionada com o processo de fusão. O T_{pico} , T_{onset} , T_{endset} e os valores de entalpias estão demonstrados na Tabela 3.4. A curva de DSC da amostra controle apresentou um pico endotérmico bem definido no qual está relacionado à transição de fase sólido-líquido ($T_{pico} = 174,93$ °C e $\Delta H_{fusão} = -142,52$ J/g).

Figura 3.2 – Curva de DSC do controle e das microcápsulas. Controle (extrato concentrado de erva-mate por nanofiltração, CM, sem adição de maltodextrina); M10 (CM com maltodextrina de DE 10,2); M15 (CM com maltodextrina de DE 15,2) e M20 (CM com maltodextrina de DE 18,6).

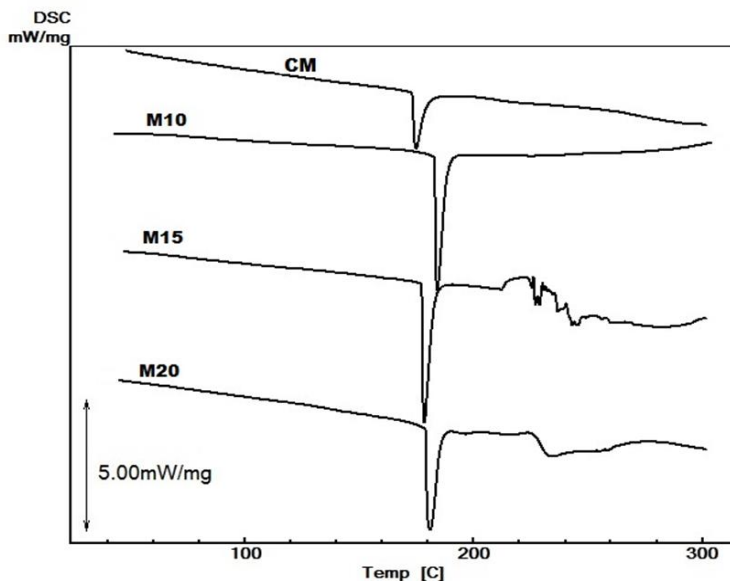


Tabela 3.4 - Resultados de DSC do Controle (extrato concentrado de erva-mate por nanofiltração, CM, sem adição de maltodextrina); M10 (CM com maltodextrina de DE 10,2); M15 (CM com maltodextrina de DE 15,2) e M20 (CM com maltodextrina de DE 18,6) apresentando o T_{pico} , T_{onset} e T_{endset} e entalpia (ΔH).

Amostras	T_{pico} (°C)	T_{onset} (°C)	T_{endset} (°C)	ΔH (J g ⁻¹)
Controle	174,93	173,31	178,92	-142,57
M10	184,24	183,09	188,28	-288,31
M15	178,5	177,33	182,72	-284,27
M20	181,04	179,05	185,67	-289,68

Controle (extrato concentrado de mate por nanofiltração, CM, sem adição de maltodextrina); M10 (CM com maltodextrina de DE 10,2); M15 (CM com maltodextrina de DE 15,2) e M20 (CM com maltodextrina de DE 18,6).

Pode ser observado que as transições de fusão das microcápsulas M10, M15 e M20, foram deslocadas para temperaturas mais altas (T_{pico}) 184,24 °C; 178,50 °C e 181,04 °C respectivamente, quando relacionadas

com o ponto de fusão da amostra controle. Esses resultados indicam que a microencapsulação promoveu uma mudança de transição sólido-líquido em temperaturas mais elevadas, tal como observado na curva DSC M10 que se deslocou cerca de 10 °C ($T_{\text{pico}} = 184,24$ °C e $\Delta H_{\text{fusão}} = -288,31$ J/g).

É importante descrever que a temperatura inicial do processo de fusão (T_{onset}) das microcápsulas mudou significativamente com os diferentes valores de DE. De fato, isso indica que existe uma possível interação física entre o extrato de erva-mate concentrado e a maltodextrina, durante o processo de encapsulação. Portanto, este comportamento de mudança de fase indica que a maltodextrina melhorou a estabilidade térmica das microcápsulas. Esse mesmo comportamento foi também observado por Nunes et al. (2015). Além disso, foi observado que as microcápsulas produzidas com maltodextrina de DE 10,2 (M10) apresentaram a melhor estabilidade térmica.

3.2 ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO

As mudanças no teor de compostos fenólicos totais (CFT) e na atividade antioxidante nas microcápsulas utilizando diferentes maltodextrinas durante o armazenamento à 5, 25 e 45 °C estão ilustradas nas Figuras 3.3 (a,b,c) e 3.4 (a,b,c), respectivamente. Os resultados de estabilidade indicam que todas as microcápsulas foram mais estáveis do que o extrato concentrado de mate (controle), nas três temperaturas avaliadas. Resultados similares foram verificados por Çam, İçyer e Erdogan (2014), que mostraram que as microcápsulas produzidas com maltodextrina foram mais estáveis do que os pós sem material de revestimento, ambos obtidos a partir de *spray dryer*. O CFT de todas as microcápsulas permaneceram inalterados durante os 90 dias na temperatura de armazenamento de 5 °C (Figura 3.3a). Devido à boa estabilidade dos compostos fenólicos durante o armazenamento à esta temperatura, as microcápsulas apresentaram boa e estável atividade antioxidante durante o mesmo período avaliado (Figura 3.4a).

Entre as microcápsulas avaliadas, a produzida com maltodextrina DE 10,2 mostrou-se mais estável em relação aos compostos fenólicos quando comparada às produzidas com maltodextrina DE 15,2 e DE 18,6, durante o armazenamento a 25 °C e 45 °C. Nessas temperaturas de estocagem, o CFT e a atividade antioxidante das microcápsulas M20 diminuíram conforme o aumento do período de armazenamento. Por exemplo, o CFT e a atividade antioxidante das microcápsulas M20

diminuíram entre 30 e 13 %, respectivamente, após 90 dias de estocagem à 25 °C, enquanto que na estocagem de 45 °C a diminuição foi de 33 e 8 %, respectivamente.

De maneira geral, a maltodextrina com DE 10,2 produziu microcápsulas mais estáveis do que as outras duas maltodextrinas. Também foi observado que a temperatura de 5 °C foi a mais adequada para o armazenamento dos pós preparados com maltodextrina em *spray dryer*. Esses resultados são similares aos obtidos por Bakowska-Barczak e Kolodziejczyk (2011), que relataram que microcápsulas preparadas com maltodextrina DE 11 foram mais estáveis do que as microcápsulas com maltodextrina DE 18 e DE 21. Dessa forma, a maltodextrina com DE 10,2 pode ser um carreador eficaz na estabilização de extrato com alta atividade antioxidante e rico em compostos fenólicos, mesmo sob condições de armazenamento adversas e, conseqüentemente, prolongando sua vida útil.

Figura 3.3 - Estabilidade ao armazenamento dos compostos fenólicos (mg/mL ácido clorogênico) de extrato de erva-mate concentrado e microencapsulado em maltodextrinas de diferentes valores de DE, a 5 °C (a), 25 °C (b), 45 °C (c) durante 90 dias. (○) Controle (extrato concentrado de mate por nanofiltração, CM, sem adição de maltodextrina); (●) M10 (CM com maltodextrina de DE 10,2); (■) M15 (CM com maltodextrina de DE 15,2) e (▲) M20 (CM com maltodextrina de DE 18,6).

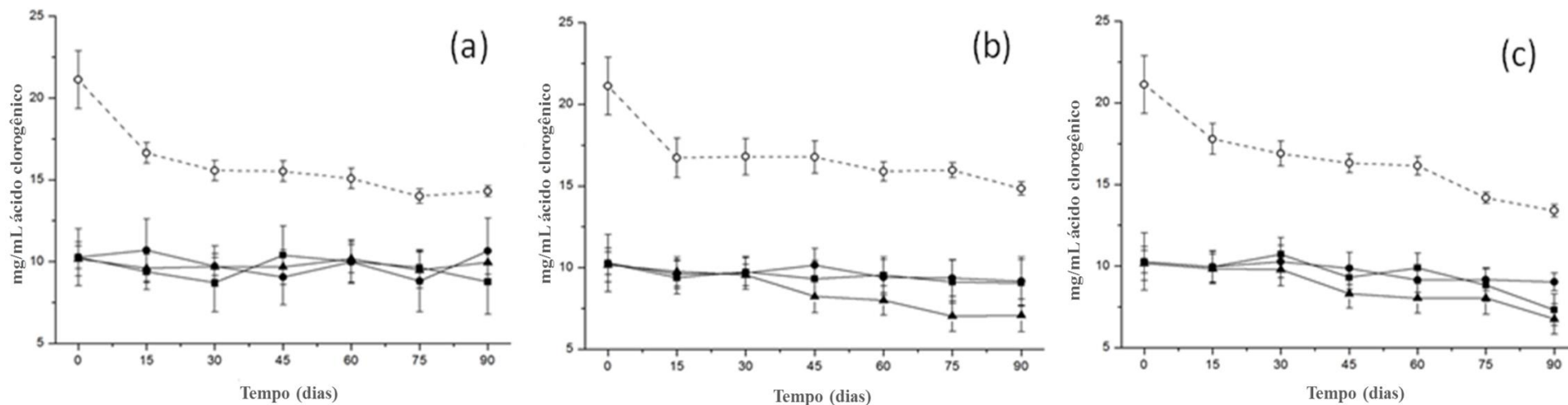
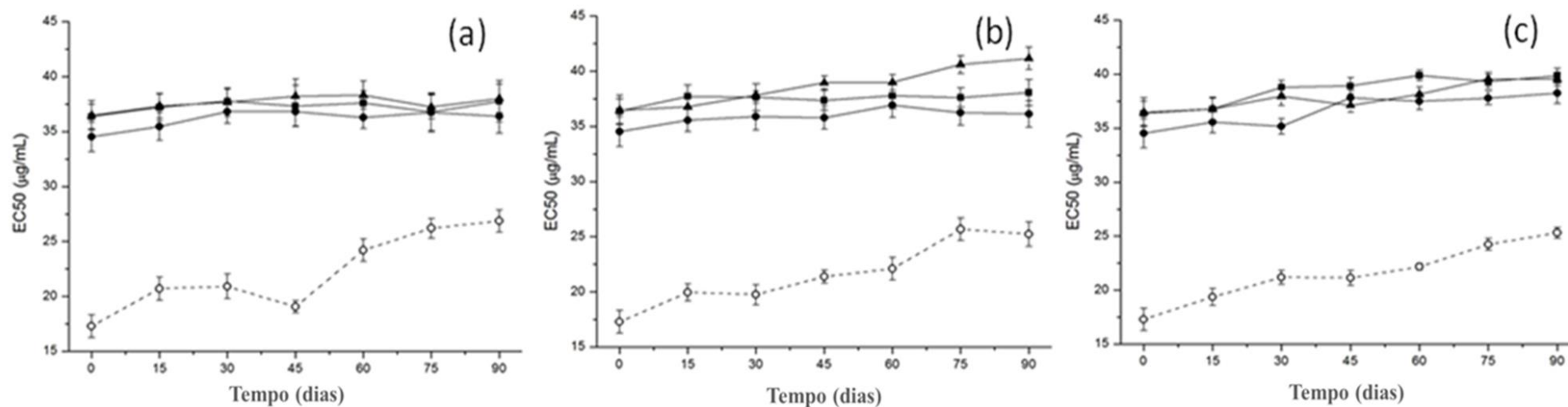


Figura 3.4 - Estabilidade ao armazenamento da atividade antioxidante (EC50 (μg/mL)) de extrato de erva-mate concentrado e microencapsulado em maltodextrinas de diferentes valores de DE, a 5 °C (a), 25 °C (b), 45 °C (c) durante 90 dias. (○) Controle (extrato concentrado de mate por nanofiltração, CM, sem adição de maltodextrina); (●) M10 (CM com maltodextrina de DE 10,2); (■) M15 (CM com maltodextrina de DE 15,2) e (▲) M20 (CM com maltodextrina de DE 18,6).



4 CONCLUSÃO

Tanto a estabilidade, quanto a eficiência no processo de *spray dryer* do extrato de erva-mate concentrado foram influenciados pelos valores de dextrose equivalente (DE) da maltodextrina, material utilizado como agente encapsulante. Os ensaios mostraram que todos os extratos encapsulados foram mais estáveis do que o extrato livre, em todas as condições avaliadas. Dos agentes encapsulantes testados nesse estudo, a maltodextrina com DE 10,2 produziu microcápsulas com maior estabilidade em relação aos compostos fenólicos, em todas as condições avaliadas, proporcionando assim uma melhor proteção desses compostos. Os resultados sugerem também que o extrato microencapsulado possui uma excelente estabilidade durante o armazenamento a 5 °C, por preservarem assim os compostos fenólicos e a atividade antioxidante. O extrato concentrado de erva-mate microencapsulado representa um aditivo alimentar promissor para incorporação em alimentos funcionais, devido à presença dos compostos fenólicos e ao potencial antioxidante.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTIS - AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists**, 18th Edition. Maryland, USA, 2005.

BAKOWSKA-BARCZK, A.M.; KOŁODZIEJCZYK, P.P. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 3101-3109, 2011.

BALZAN, S.; HERNANDES, A.; REICHERT, C. L.; DONADUZZI, C.; PIRES, V. A.; JUNIOR, A. G.; JUNIOR, E.L.C. Lipid-lowering effects of standardized extracts of *Ilex paraguariensis* in high-fat-diet rats. **Fitoterapia**, v. 86, p. 115-122, 2013.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BLUM-SILVA, C. H.; CHAVES, V. C.; SCHENKEL, E. P.; COELHO, G. C.; REGINATTO, F. H. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 1-6, 2015.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378–384, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CAI, Y.Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 1248-1252, 2000.

ÇAM, M.; İÇYER, N.C.; ERDOĞAN, F. Pomegranate peel phenolics: microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 117-123, 2014.

- CONIDI, C.; CASSANO, A.; DRIOLI, E. Recovery of phenolic compounds from orange press liquor by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 867-874, 2012.
- DE MEJIA, E. G.; SONG, Y. S.; HECK, C. I.; RAMIREZ-MARES, M. V. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): phenolics, antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 23-34, 2010.
- DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p. 1361-1394, 2005.
- EL-TINAY, A.H., ISMAIL, I.A. Effect of some additives and processes on the characteristics of agglomerated and granulated spray-dried Roselle powder. **Acta Alimentaria Hungaricae**. v. 14, p. 283–295, 1985.
- ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota L.*) by spray drier. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 805–812, 2007.
- FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, p. 510-523, 2010.
- FAZAELI, M.; EMAM-DJOMEH, Z.; ASHTARI, A. K.; OMID, M. Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 667-675, 2012.
- FRITZEN-FREIRE, C.B.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMBONI, R.D.M.C.; PINTO, S.S.; MURAKAMI, A.N. N.; MURAKAMI, F. Microencapsulation of bifidobacteria by *spray drying* in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, p. 306-312, 2012.
- HECK, C.I.; DE MEJÍA, E.G. Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 138–151, 2007.
- JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y. H.; BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, p. 816-835, 2008.
- KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability

of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 737-743, 2004.

LIAN, W.C.; HSIAO, H.C.; CHOU, C.C. Survival of bifidobacteria after *spray drying*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 79-86, 2002.

MATTA, V.M.; MORETTI, R.H.; CABRAL, L.M.C. Microfiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of acerola juice. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 477-482, 2004.

MURAKAMI, A. N. N.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; ZANOTTA, L.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C. C.; TEÓFILO, R. F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 2211-2216, 2011.

MURAKAMI, A. N. N.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; BOAVENTURA, B. C. B.; MUNOZ, I. B.; BRANCO, C. S.; SALVADOR, M.; MARASCHIN, M. Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration. **Food Chemistry**, v. 141, p. 60-65, 2013.

NADEEM, H. S.; TORUN, M.; OZDEMIR, F. Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1626-1635, 2011.

NUNES, G. L.; BOAVENTURA, B. C. B.; PINTO, S. S.; VERRUCK, S.; MURAKAMI, F. S.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60-68, 2015.

PANG, S. F.; YUSOFF, M. M.; GIMBUN, J. Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 159-165, 2014.

PIMENTEL, G. D.; LIRA, F. S.; ROSA, J. C.; CARIS, A. V.; PINHEIRO, F.; RIBEIRO, E. B.; NASCIMENTO, C. M. O.; OYAMA, L. M. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 809-818, 2013.

PRUDÊNCIO, A. P. A.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C.; MURAKAMI, A. N. N.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C. C.; OGLIARI, P. J.; LEITE, R.S. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 399-405, 2012.

RE´, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, p. 1195-1236, 1998.

ROBERT, P.; GORENA, T.; ROMERO, N.; SEPULVEDA, E.; CHAVEZ, J.; SAENZ, C. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1386-1494, 2010.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 139-144, 1985.

SINGLETON, V.L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-149, 1965.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried acai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. **Food Research International**, v. 43, p. 907-914, 2009.

TONON, R. V.; FREITAS, S.S.; HUBINGER, M. D. Spray drying of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice: effect of inlet air and type of carrier agent. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 35, p. 691-700, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi o pioneiro na aplicação da tecnologia de nanofiltração no extrato aquoso de folhas erva-mate. A concentração do extrato aquoso de folhas de erva-mate por nanofiltração apresentou resultados satisfatórios, pois houve um aumento significativo no teor de compostos com atividade biológica, como os compostos fenólicos, ácido clorogênico, teobromina, cafeína, clorofila, taninos condensados, saponinas, além de aumentar a atividade antioxidante *in vitro*. No entanto, como forma de melhorar e ampliar o potencial uso deste extrato, ele foi microencapsulado pelo processo de *spray drying* utilizando maltodextrinas com diferentes valores de dextrose equivalente (DE). Todas as microcápsulas apresentaram resultados significativamente melhores em relação compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, teor de umidade, atividade de água, higroscopicidade, morfologia, dissolução, análise de cor, calorimetria exploratória diferencial e estabilidade de armazenamento quando comparadas ao extrato concentrado livre. Entretanto, as microcápsulas produzidas com maltodextrina de DE 10,2 apresentaram melhores características físicas, químicas e de estabilidade durante o armazenamento em diferentes temperaturas.

O extrato de erva-mate concentrado por nanofiltração e microencapsulado por *spray drying* utilizando maltodextrina com DE 10,2 como agente encapsulante pode ser utilizado como matéria prima no desenvolvimento de produtos alimentares e de produtos farmacêuticos. Contudo, sugerem-se estudos de digestibilidade gástrica e intestinal *in vitro* e *in vivo* para verificar benefícios para a saúde humana e possíveis aplicações em diversos alimentos, como, por exemplo, em leite em pó, sucos em pó, barras de cereais e gelatinas em pó.

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGO “CONCENTRATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS EXTRACTED FROM *ILEX PARAGUARIENSIS* ST. HIL. BY NANOFILTRATION” PUBLICADO NO “FOOD CHEMISTRY” (ISSN: 0308-8146)

Food Chemistry 141 (2013) 60–65



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemConcentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration

Aureanna Nairne Negrão Murakami^a, Renata Dias de Mello Castanho Amboni^{a,*},
Elane Schwinden Prudêncio^a, Edna Regina Amante^a, Carlise Beddin Fritzen-Freire^a,
Brunna Cristina Bremer Boaventura^a, Isabella de Bona Muñoz^a, Catia dos Santos Branco^b,
Miriam Salvador^b, Marcelo Maraschin^c

^a Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, 88034-001 Florianópolis, SC, Brazil^b Department of Biochemistry, University of Casias do Sul, 95070-560 Casias do Sul, RS, Brazil^c Department of Phytotechny, Federal University of Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, 88034-001 Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 November 2012

Received in revised form 25 February 2013

Accepted 28 February 2013

Available online 14 March 2013

Keywords:

Ilex paraguariensis

Bioactive compounds

Aqueous extract

Antioxidant activity

Concentration

Nanofiltration

ABSTRACT

The aim of this study was to characterise the bioactive compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) extract and in concentrated mate extract obtained by nanofiltration (NF). Also, the impact of NF on the antioxidant activity of both mate extracts was evaluated *in vitro* using eukaryotic cells of *Saccharomyces cerevisiae* (yeast assay). The results showed a significant increase in the contents of total phenolics (338%), chlorogenic acid (483%), theobromine (323%), caffeine (251%), chlorophyll (321%), condensed tannins (278%) and saponins (211%) in the concentrated mate extract. The concentrated mate extract showed higher *in vitro* antioxidant activity than the mate extract. According to the results obtained, it can be stated that the use of nanofiltration membrane is a valid approach for the concentration of biologically active compounds in aqueous extract of mate.

© 2013 Elsevier Ltd. Open access under the [Elsevier OA license](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

1. Introduction

The *Ilex paraguariensis* St. Hil., more commonly known as yerba-mate or mate, is a plant that is native to the subtropical region of South America and is widely consumed and produced in southern Brazil, Argentina, Uruguay and Paraguay. In these countries, the infusion or decoction of the aerial parts of mate is widely used to make different beverages such as *chimarrão* and *tereré*, which are consumed in amounts of more than one litre per day by millions of people and are also the main alternative to coffee and tea (Morais et al., 2009). This plant is very rich in different biologically active compounds, such as phenols, methylxanthines, triterpene saponins, flavonoids, minerals, and others. It is widely used in folk medicine because of its many health-promoting effects, such as anti-inflammatory, anti-obesity and anti-cancer, and mainly antioxidant activity (Heck & Mejia, 2007).

Concentration of the biologically active compounds present in mate is generally performed by solid–liquid extraction, which promotes a significant dilution. The occurrence of such dilution is attributable to several factors, such as limited quantity of solid content and overall nutritional composition, which can vary according to the different regions and times of harvesting, among other factors. Besides, the traditional approaches used for concentrating biologically active compounds from natural products include simple steam-and-vacuum distillation, which generally requires high temperature and high energy consumption. These methods may result in nutritional loss caused by the instability of bioactive compounds, due to the application of a high temperature for a long period of time (Sonaglio, Ortega, Petrovick, & Bassani, 2007).

The utilisation of membrane technologies for concentrating bioactive compounds from natural products has been successfully employed, for example, with *Ginkgo biloba* extract (Xu & Wang, 2005). Compared to the traditional methods used for concentrating biologically active compounds, membrane concentration process reveals new possibilities because of advantages, such as working at ordinary temperatures, absence of phase transition, and low energy consumption (Santamaría, Salazar, Beltrán, & Cabezas, 2002). This procedure is based on the principle of selective perme-

* Corresponding author. Address: Laboratório de Frutas e Hortaliças, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346 Itacorubi, 88034-001 Florianópolis, SC, Brazil. Tel.: +55 48 37215384; fax: +55 48 37219943. E-mail address: ramboni@cca.ufsc.br (Renata Dias de Mello Castanho Amboni).

ation of the solute molecules through semi-permeable membranes. The liquid that is retained by the membrane is called concentrate and the liquid that passes through it is called permeate. In most membrane processes, such as microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration, and reverse osmosis, the driving force for mass transfer across the membrane is mechanical pressure (Maroulis & Saravacos, 2003, chap. 10). The main advantage of employing NF membranes for the concentration of bioactive compounds of mate is that by selecting membranes with suitable molecular weight cut-off (MWCO), this technology can be used to fractionate molecules of similar molecular weight (100–1000 Da range).

The aim of this work was to characterise the bioactive compounds in extract and concentrated extract of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Besides evaluating the effects of NF on these valuable bioactive compounds, in this work we also evaluated the antioxidant activity of these mate extracts *in vitro* and using eukaryotic cells of *Saccharomyces cerevisiae* (yeast assay).

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Hydrochloric acid, sodium hydroxide, sodium carbonate, ethanol, methanol, dichloromethane, chloroform, acetonitrile, glacial acetic acid, sodium chloride, formic acid and *n*-butanol were obtained from Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil). The Folin–Ciocalteu phenol reagent, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), vanillin, tannic acid, chlorogenic acid, gallic acid, perchloric acid, caffeine, theobromine, ursolic acid and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All reagents were either of analytical or of chromatographic grade.

2.2. Plant material

The leaves of *Ilex paraguariensis* St. Hil. used for the preparation of the extract were harvested in Catanduvas, Santa Catarina state, Brazil. After the leaves were picked, they were washed and the excess water on the surface of the leaves was removed by centrifugation. After that, the leaves were dried in a forced air oven (FABBE, 171, São Paulo, Brazil) for 24 h at 45 °C and then they were ground with a knife mill (Marconi, MA-580, Piracicaba, Brazil) until reaching a particle size smaller than 3.55 mm. The ground leaves were placed in plastic bags and kept at –18 °C until the preparation of the aqueous extracts.

2.3. Preparation of the mate extract

The mate extract was produced according to Murakami et al. (2011), using 3 g of ground leaves suspended in 100 mL of distilled water with constant stirring. The pH was adjusted to 6.0 by adding either 0.1 N hydrochloric acid or 0.1 N sodium hydroxide solutions and using a pH meter (Quimis, Q-400A, Diadema, SP, Brazil). The extracts were filtered with filter paper (12.5 cm diameter and 25 µm pore size) using a vacuum pump (Primatec, 131, Itu, Brazil) and the extract volumes were made up to 100 mL with distilled water (resulted to as 3 g/100 mL extracts).

2.4. Concentration of the mate extract

Nanofiltration (NF) was applied to concentrate biologically valuable components of mate extract. The concentration was performed with a tangential filtration system on a pilot scale equipped with a spiral membrane module (Osmonics membranes, HL2521TF, Minnetonka, MN), with a MWCO ranging between

150 and 300 Da, 0.6 m² of filtration area and 98% rejection of MgSO₄ in a test performed by manufacturing with a spiral module at 25 °C and 690 kPa. The experiment was performed on pilot equipment (Fig. 1) that allows batch circulation, meaning that both the permeate and the concentrate could be carried back to the feed tank. The permeate was totally removed, in order to obtain the concentrated mate extract.

The operating parameters during the NF process were temperature of 24 ± 1 °C and pressure of 300 kPa, up to a VRF (volumetric reduction factor) of 4. As was expected, a decrease in permeate flux was observed throughout the time, due to concentration polarisation and fouling of membrane. A permeate flux was obtained between 0.50 and 24.0 L/h.m², while the average permeate flux was equal to 4.53 L/h.m². After each processing, the pilot unit and membrane were cleaned and sterilised, according to the manufacturer's instructions.

2.5. Analytical methods

The characterisation of the mate extract and concentrated mate extract was used to evaluate the effects of membrane separation on the profile of the biologically active compounds present in the leaves of *Ilex paraguariensis*.

2.5.1. Total phenolic content and chlorogenic acid

The total polyphenol contents (TPC) of the extracts were determined following a Folin–Ciocalteu procedure (Singleton, Joseph, & Rossi, 1965). The appropriate dilutions of extracts were oxidised with Folin–Ciocalteu reagent and its reaction was neutralised with sodium carbonate. The absorbance of the resulting blue colour was measured at 765 nm, after 60 min, with a UV–Vis spectrophotometer (Model U-1800; Hitachi, Tokyo, Japan). The TPC was expressed as gallic acid equivalents (GAE) in mg per mL of extract (mg GAE/mL).

The determination of chlorogenic acid was performed using an HPLC system (Shimadzu LC-10, Kyoto, Japan) equipped with a reverse-phase column (Shim-pack C18, 4.6 mm Ø × 250 mm), thermostated at 40 °C, and a UV–Vis detector (Shimadzu SPD 10A, λ = 280 nm). An isocratic mobile phase of water:acetic acid:*n*-butanol (350:1:10 v/v/v) was used at a flow rate of 0.8 mL/min. The injection volume was 10 µL. For the quantitative analysis, a standard calibration curve was obtained by plotting the peak area against different concentrations of chlorogenic acid. The curve showed a good linearity and followed Beer's Law ($r^2 = 0.99$). Similarly, the final concentration of chlorogenic acid present in the samples was determined as average content after three consecutive injections.

2.5.2. Methylxanthine compounds

A volume of 15 mL of each extract was treated with 60 mL of dichloromethane for 1 h and the organic phase was concentrated to 2 mL under reduced pressure. The HPLC analysis was performed on a Shimadzu LC-10A system equipped with a UV–Vis detector SPD 10A set at 272 nm. The experiments were carried out on a reversed-phase Shim-pack C₁₈ (4.6 mm Ø × 250 mm) column. The system was operated isocratically at 30 °C using a mobile phase composed of acetonitrile:0.1% formic acid (15:85 v/v), with a flow rate of 1.0 mL/min. Prior to injection, all the samples were centrifuged at 2800g for 10 min (Hermle, Z 200A, Wehingen, Germany) and filtered through 0.22-µm micropore membranes.

The injection volume was 10 µL for the mate extract and 5 µL for the concentrated mate extract. For quantitative analysis, standard calibration curves were obtained for caffeine (1.0–100.0 µg/mL; $r^2 = 0.99$) and for theobromine (2.5–50 µg/mL; $r^2 = 0.99$). The final concentrations of each sample were determined by three consecutive injections (Strassmann et al., 2008).

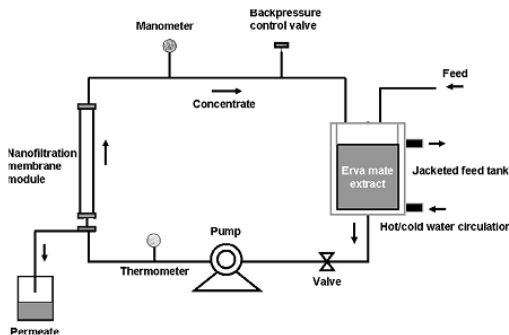


Fig. 1. Schematic diagram of the nanofiltration unit.

2.5.3. Total saponins content

The extraction procedure was performed according to Gnoatto, Shenkel, and Bassani (2005). The saponins present in 10 mL of each of the two extracts were hydrolysed with 5 mL of HCl (12 M) for 2 h under reflux. The saponins were extracted with 6 mL of chloroform. The organic phase was evaporated in a rotary evaporator and the residue was resuspended in 10 mL of ethanol.

Determination of the total triterpene saponins content was conducted using the colorimetric method of Xiang, Tang, Chen, and Shi (2001) with slight modifications. The principle of this method is the reaction of oxidised triterpene saponins with vanillin. Perchloric acid is the strong oxidant and the distinctive colour of this reaction is purple. Aliquots from the ethanolic phase were totally evaporated and then 150 μ L of 5% (w/v) vanillin/glacial acetic acid solution and 500 μ L of perchloric acid were added to the dry residue obtained. The mixture was incubated at 60 $^{\circ}$ C for 45 min, cooled down in an ice bath and then added with glacial acetic acid. The absorbance rate was measured with a UV/Vis spectrophotometer (Hitachi, U-1800) at 548 nm. The total saponins content was quantified by using a standard calibration curve of ursolic acid ($y = 0.00087205 - 0.02339x$; $r^2 = 0.99$), the major triterpene nucleus of *Ilex paraguariensis*.

2.5.4. Condensed tannins content

The methodology to determine the condensed tannins content is described in this present work consists of two stages: stage A, where the total polyphenols are quantified; and stage B, where residual polyphenols are quantified after adsorption of tannins by gelatin (Valdes, Leyes, & León, 2000). In stage A, 4.5 mL of extract were treated by adding 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent and 0.5 mL of sodium carbonate (20%). This mixture was then stirred and the volume was made up with distilled water to 125 mL. The absorbance was measured with a UV/Vis spectrophotometer (Hitachi, U-1800) at 700 nm, after 2 min. In stage B, 10 mL of extract were diluted in 40 mL of distilled water and added with 25 mL of gelatin (25%). After that, 50 mL of an acidified saturated solution of 1% sodium chloride and 5 g of kaolin were added to the solution. The solution was then capped and stirred for 30 min (700g) and immediately afterwards it was filtered. From this solution, the procedure of stage A was repeated. The condensed tannins were quantified by using a standard calibration curve of tannic acid (1.0–10.0 mg/mL; $r^2 = 0.97$; $y = 0.0869x + 0.0785$).

2.5.5. Chlorophyll content

One millilitre of each extract was added to 7 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) and the mixture was then placed in an oven at 65 $^{\circ}$ C for 15–20 min. After that, 3 mL of the obtained solution were analysed with a UV/Vis spectrophotometer (Hitachi U-1800) set at 645 and 663 nm. The DMSO reagent was used as a blank solution. The results showed the content of total chlorophyll (Hiscox & Israelstam, 1979).

2.5.6. Antioxidant activity in vitro

The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) assay was based on the method proposed by Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995). An aliquot of 0.1 mL of each extract was mixed with 3.9 mL DPPH in methanol (60 μ M). The mixture was vigorously shaken and then the absorbance rate was measured at 515 nm every 10 min until it stabilised (Hitachi U-1800). Methanol was used as a blank instead of DPPH solution. EC_{50} value (μ g extract/mL) is the effective concentration at which DPPH radicals were scavenged by 50% and it was obtained by interpolation from linear regression analysis.

2.5.7. Antioxidant activity (yeast assay)

The evaluation of antioxidant activity was carried out using eukaryotic cells of *S. cerevisiae* strain XV185-14c (MAT α , ade2-2, arg4-17, his1-7, lys1-1, trp5-48, hom3-10). Yeast cell suspensions containing 2×10^7 cells/mL (exponential phase) were treated with 75 mM hydrogen peroxide, in the presence of concentrated and mate extracts. This dilution was the highest non-cytotoxic concentration of both extracts determined in preliminary assays. The tubes were incubated for 1 h at 28 $^{\circ}$ C. The samples were then serially diluted in saline solution (0.9% w/v), plated onto YPD (10 g/L of yeast extract, 20 g/L of peptone, 20 g/L of dextrose and 20 g/L of agar-agar) and incubated at 28 $^{\circ}$ C for 48 h. After incubation, the colonies were counted, and 100% survival was considered the total number of colonies observed on the control plate (untreated cells) (Wilmens, Spada, & Salvador, 2005).

2.6. Statistical analysis

All the data were evaluated using the software STATISTICA version 6.0 (2001) (StatSoft Inc., Tulsa, OK) and expressed as mean \pm standard deviation (SD) of triplicate measurements. Tu-

Table 1
Chemical compositions of the mate extract and of the concentrated mate extract.

	Concentrated mate extract	Mate extract
Total phenolic content (mg GAE/mL)	7.82 ± 0.039 ^a	2.32 ± 0.003 ^b
Chlorogenic acid (µg/mL)	9004 ± 165 ^a	1862 ± 3.49 ^b
Methylxanthines (µg/mL)		
Caffeine	3142 ± 367 ^a	1253 ± 72.5 ^b
Theobromine	171 ± 10.51 ^a	53.1 ± 1.44 ^b
Total saponins content (µg/mL)	366 ± 14.01 ^a	173 ± 5.14 ^b
Condensed tannins content (g TA/100 g d.e.)	35.6 ± 0.42 ^a	12.8 ± 0.74 ^b
Total chlorophyll content (µg/mL)	36.0 ± 3.42 ^a	11.2 ± 0.31 ^b

Data are mean ± SD (n = 3); TA: Tannic acid; d.e.: dry extract.

Mean values in the same line followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

key's studentised range test was carried out to test for any significant differences between the mate extract and concentrated mate extract. A difference was considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results and discussion

The chemical compositions of the mate extract and the concentrated mate extract are shown in Table 1. Significant changes occur in the concentration of bioactive compounds of mate extract after nanofiltration (NF). Concentration by NF does not occur only because of the MWCO of the membrane; it can also occur because of the common structural properties of hydrophobic compounds, which generally include aromatic (benzene) ring structures that have aliphatic carbon groups which, if undissociated in pH conditions lower than their pKa values, can be readily adsorbed in this kind of hydrophobic membrane (Yoon, Westerhoff, Snyder, & Wert, 2006).

As noted by Murakami et al. (2011) and by Prudêncio et al. (2012) with mate leaf extract and mate bark extract, in this present study it was possible to concentrate bioactive compounds from mate extract by NF (Table 1). The content of chlorogenic acid was determined because it is present in higher concentrations in mate (Pagliosa et al., 2010). Fig. 2(a) shows a representative HPLC-DAD chromatogram of chlorogenic acid identified and quantified in the mate samples. The same behaviour obtained by Murakami et al. (2011) was verified in this present study, i.e., the concentration of chlorogenic acid increased after nanofiltration.

The methylxanthine content in the concentrated mate extract was higher ($p < 0.05$) than in the mate extract. Fig. 2(b) shows a representative HPLC-DAD chromatogram of the methylxanthines identified and quantified in the mate samples. After nanofiltration, the concentration of theobromine (323%) increased more than the concentration of caffeine (251%). As expected, the theobromine content was much lower than the caffeine content in both extracts. The large amount of caffeine in the leaves of *Ilex paraguariensis* not only is responsible for the stimulant effect of mate, but it is also responsible for several other biological activities. Silva et al. (2011) suggested that mate consumption could decrease body weight and adiposity, most probably because of caffeine's ability to increase thermogenesis. Moreover, Strassmann et al. (2008) noted that treatments performed with mate extract and with caffeine on the vascular membranes of chick embryos yolk sac showed pro-vasculogenic and angiogenic properties and also embryonic growth enhancement. However, based on available evidence, it is suggested that caffeine intake should be less than 300 mg caffeine per day (equivalent to 4.6 mg/kg/day in a 65 kg person) while children should consume less than 2.5 mg/kg/day; Nawrot et al., 2003).

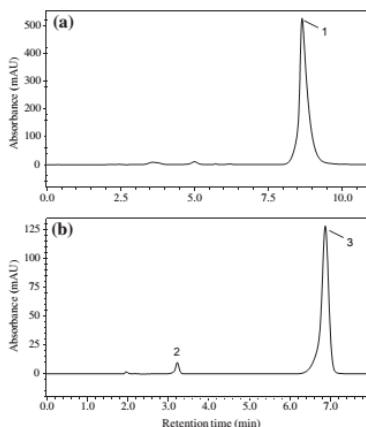


Fig. 2. Representative HPLC-DAD chromatogram of mate extract: (a) phenolic compounds with signal at 280 nm; and (b) methylxanthines with signal at 272 nm; (1) chlorogenic acid; (2) theobromine; (3) caffeine.

The leaves of *Ilex paraguariensis* contain a significant amount of triterpenoid saponins. These compounds are highly water-soluble and are responsible for the typically bitter taste of mate. Saponins may be used as a chemical fingerprint for authentication of mate. Adulteration by variable quantities of leaves of other *Ilex* species is rather common (Heck & Mejia, 2007). Concentration of mate extract by NF increased the total saponin content by 211%. According to the data in Table 1, the total saponin content of the concentrated mate extract was 366 ± 14.0 µg/mL. Similar results were reported by Silva et al. (2011) for aqueous extract of unprocessed mate, 387 ± 1.58 µg/mL; however, the concentration of the extract used in that study was 7 g of ground leaves in 100 mL of water. Such high saponin content in concentrated mate extract not only affects the flavour of the extract, but also provides hypocholesterolaemic properties. The potential cholesterol-lowering properties were reported in a work of Moraes et al. (2009), where consumption of approximately 130 and 350 mg of saponins in yerba mate infusion provided further decrease in LDL-cholesterol in subjects undergoing statin therapy. Puangraphant, Berhow, and Mejia (2011) also stated that the saponins of mate prevent inflammation and colon cancer *in vitro*.

The concentrated mate extract showed an amount of condensed tannins approximately 278% higher than the mate extract. Studies on condensed tannins take on greater importance when considering the impact of these compounds on nutrition. Despite the known antinutritional activity of condensed tannins, Okuda (2005) reported several health-promoting effects of these compounds, such as inhibition of lipid peroxidation, carcinogen mutagenicity, and tumours, and at the same time they promote antiviral activity, and potentiation of antibacterial activity.

In addition, according to the results shown in Table 1, the concentration of total chlorophyll content in the concentrated mate extract obtained by NF was 321% higher compared to that of the mate extract. Ferruzzi and Blakeslee (2007) reported that chloro-

phylls have properties that are proven to benefit the human body, such as antioxidant activity, antimutagenic activity, modulation of xenobiotic metabolising enzymes, and induction of apoptotic events in cancer cell lines. Moreover, chlorophyll gives an indirect estimation of the nutrient status because much of the leaf nitrogen is incorporated in chlorophyll (Ferruzzi & Blakeslee, 2007).

Antioxidants are substances that counteract free radicals and prevent the damage they cause. These substances can greatly reduce the damage caused by oxidants by breaking them down before they react with biological targets, preventing either chain reactions or activation of oxygen to give highly reactive products (Ratnam, Ankola, Bhardwaj, Sahana, & Ravi Kumar, 2006). The results in Table 2 show that the concentrated mate extract had better ($p < 0.05$) antioxidant activity *in vitro* in comparison to the mate extract. Prudêncio et al. (2012) and Boaventura et al. (2012) also noted substantial differences between DPPH EC₅₀ in the mate aqueous extracts of bark and leaves after concentration processes. The well-known antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* is related to the presence of several compounds, mainly chlorogenic acid (Anesini, Turner, Cogoi, & Filip, 2012). However, tests that measure antioxidant activity *in vitro* do not always show this behaviour *in vivo*. Wilmsen et al. (2005) reported that the evaluation of antioxidant activity using *S. cerevisiae* yeast as a biological system model is a quick test that shows representative results for studies of oxidative stress in eukaryotic cells treated with hydrogen peroxide.

Both the samples that were evaluated were able to protect the yeast cells against damage caused by hydrogen peroxide (Table 2). Additionally, the results obtained in this present study indicate that the phenolic compounds present in the samples play an important role in antioxidant activity. Differences ($p < 0.05$) in the survival rates of the *S. cerevisiae* yeast treated with hydrogen peroxide of mate and concentrated mate extracts were noted in this present study. However, antioxidant activity does not seem to depend exclusively on total polyphenol content. As observed by Stefenon et al. (2010) in red sparkling wines, samples with significant amounts of phenolic compounds did not show the highest antioxidant activity. Medina et al. (2011) also noted there was no correlation with the antioxidant activity measured by DPPH in araçá extract. It is possible that the lower protection of yeast cells against damage caused by hydrogen peroxide is due to condensation reactions influenced by nanofiltration. Halliwell (2008) reported that, under certain experimental conditions and in high concentrations, some polyphenols such as phenolic acids can exert pro-oxidant activities, forming compounds that have toxic effects and may cause cell death. The high concentrations of phenolic compounds in the concentrated mate extract obtained by NF probably explain their lower protective effect over yeast cells. Addi-

tional studies are under way to identify other compounds that are possibly present in these extracts and that may be further developed for nutraceutical and therapeutic applications.

4. Conclusions

It can be stated that the use of nanofiltration is a valid approach for the concentration of biologically active compounds in aqueous extract of mate. The results showed that there was a significant increase in the contents of total phenolics, chlorogenic acid, methylxanthines, chlorophyll, and saponins, all of which are compounds that may have an important role in maintaining good health. Moreover, the mate extract and the concentrated mate extract showed differences in the survival rates of the *S. cerevisiae* yeast treated with hydrogen peroxide.

Acknowledgements

The authors are thankful to Jozeane Caldart and Anselmo Zanellatto, for helping with the selection of the samples, and to the FINEP (Agency for Financing Research and Projects, Brazil) and the SEBRAE (Agency for Support to Small and Micro Companies, Brazil), for their financial support through the Projeto Ervanova, and also to Dr. R. C. Von Borstel (Genetics Department, Alberta University, Canada) for kindly providing the yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain XV185-14c (MAT α , ade2-2, arg4-17, his1-1, lys1-1, trp5-48, hom3-10).

References

- Anesini, C., Turner, S., Cogoi, L., & Filip, R. (2012). Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). *LWT – Food Science and Technology*, 45(2), 299–304.
- Boaventura, B. C. B., Murakami, A. N. N., Prudêncio, E. S., Maraschin, M., Murakami, F. S., Amante, E. R., & Amboni, R. D. M. C. (2012). Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. *Food Research International*, in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.042>.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 25–30.
- Ferruzzi, M. C., & Blakeslee, J. (2007). Digestion, absorption and cancer preventive activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, 27, 1–12.
- Gnoatto, S. C. B., Shenkel, E. P., & Bassani, V. L. (2005). HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(4), 723–726.
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476, 107–112.
- Heck, C. I., & Mejia, E. G. (2007). Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, 72, 138–151.
- Hiscox, J. D., & Israelstam, G. F. (1979). A method for extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57(12), 1332–1334.
- Maroulis, Z. B., & Saravacos, G. D. (2003). *Food process design*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Medina, A. L., Haas, L. I. R., Chaves, F. C., Salvador, M., Zambiasi, R. C., Da Silva, W. P., et al. (2011). Açacá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. *Food Chemistry*, 128(4), 916–922.
- Morais, E. C., Stefanuto, A., Klein, G. A., Boaventura, B. C. B., Andrade, F., Waslawik, E., et al. (2009). Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8316–8324.
- Murakami, A. N. N., Amboni, R. D. M. C., Prudêncio, E. S., Amante, E. R., Zanotta, I. M., Maraschin, M., et al. (2011). Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) extract through nanofiltration. *Food Science and Technology*, 44(10), 2211–2216.
- Navrojt, P., Jordan, S., Eastwood, J., Robinson, J., Hugenholz, A., & Feeley, M. (2003). Effects of caffeine on human health. *Food Additives & Contaminants*, 20(1), 1–30.
- Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, 66(17), 2012–2031.
- Pagliosa, C. M., Simas, K. N., Amboni, R. D. M. C., Murakami, A. N. N., Petkowicz, C. L. O., Medeiros, J. D., et al. (2010). Characterization of the bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Industrial Crops and Products*, 32, 428–433.

Table 2

DPPH⁺ mean values for the concentrated mate extracts and mate extracts analysed, and mean survival values of *Saccharomyces cerevisiae* yeast treated with hydrogen peroxide (H₂O₂, 75 mM) in presence and absence of concentrated mate extracts and mate extracts.

	DPPH ⁺ EC ₅₀ value (μg/mL) ± SD
Mate extract	130 ± 4.12 ^a
Concentrated extract	4.19 ± 1.23 ^b
	Survival (%) ± SD
Water	100.00 ± 0.00 ^a
H ₂ O ₂ 75 mM	45.00 ± 0.00 ^d
Mate extract 0.01% + H ₂ O ₂ 75 mM	86.65 ± 5.65 ^b
Concentrated extract 0.01% + H ₂ O ₂ 75 mM	67.53 ± 3.53 ^c

Data are mean ± SD (standard deviation) (n = 3).

Mean values in the same line followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

EC₅₀: % of amount of samples necessary to scavenge 50% of DPPH⁺.

- Puangraphant, S., Berhow, M. A., & Mejia, E. G. (2011). Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilare) saponins induce caspase-3-dependent apoptosis in human colon cancer cells in vitro. *Food Chemistry*, 125, 1171–1178.
- Prudêncio, A. P. A., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Murakami, A. N. N., Maraschin, M., Petrus, J. C. C., et al. (2012). Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. *Food and Bioprocess Technology*, 90(3), 399–405.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., & Ravi Kumar, M. N. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113(3), 189–207.
- Santamaría, B., Salazar, G., Beltrán, S., & Cabezas, J. L. (2002). Membrane sequences for fractionation of polyphenolic extracts from defatted milled grape seeds. *Desalination*, 148, 103–109.
- Silva, R. D., Bueno, A. L. S., Gallon, C. W., Gomes, L. F., Kaiser, S., Pavei, C., et al. (2011). The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male wistar rats. *Fitoterapia*, 82, 819–826.
- Singleton, V. L., Joseph, A., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–149.
- Sonaglio, D., Ortega, G. C., Petrovick, P. R., & Bassani, V. L. (2007). Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz, & P. R. Petrovick (Eds.), *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento* (pp. 289–326). Porto Alegre, Brazil: Editora da UFRG/ Editora da UFSC.
- Stefanon, C. A., Colombo, M., Bonesi, C. d. M., Marzarotto, V., Vanderlinde, R., Salvador, M., et al. (2010). Antioxidant activity of sparkling wines produced by champenoise and charmat methods. *Food Chemistry*, 119(1), 12–18.
- Strassmann, B. B., Vieira, A. R., Pedrotti, E. L., Morais, H. N. F., Dias, P. F., & Maraschin, M. (2008). Quantitation of methylanthranic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8348–8353.
- Valdes, H. L., Leyes, E. R., & León, H. P. (2000). Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. *Revista Cubana Plantas Medicinales*, 5, 17–22.
- Wilmsen, P. K., Spada, D. S., & Salvador, M. (2005). Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4757–4761.
- Xiang, Z. B., Tang, C. H., Chen, G., & Shi, Y. S. (2001). Studies on colorimetric determination of oleanolic acid in Chinese quince. *Natural Product Research and Development*, 13(4), 23–26.
- Xu, L., & Wang, S. (2005). The *Ginkgo biloba* extract concentrated by nanofiltration. *Desalination*, 184, 305–313.
- Yoon, Y., Westerhoff, P., Snyder, S. A., & Wert, E. C. (2006). Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products. *Journal of Membrane Science*, 270, 88–100.

Acesso do artigo em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613002823>

ANEXO B – COMPROVANTE DO ENVIO DO ARTIGO INTITULADO “INFLUENCE OF DE-VALUE OF MALTODEXTRIN ON PHYSICOCHEMICAL, ANTIOXIDANT PROPERTIES, AND STORAGE STABILITY OF CONCENTRATED MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS* A. ST. HIL.) SPRAY DRIED” PARA A REVISTA LWT – FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

